UNIVERSITE PARIS-SUD

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE D'HYGIENE ET PROTECTION DE L'HOMME ET DE SON ENVIRONNEMENT

Année 1973-1974 Série E. N° 9

THESE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE D'HYGIENE ET PROTECTION DE L'HOMME ET DE SON ENVIRONNEMENT DE L'UNIVERSITE PARIS - SUD

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Yvonne **LE GARREC**

Titre de la Thèse :

VARIATION LISSE-RUGUEUSE chez BRUCELLA ABORTUS : quelques aspects immunologiques et immunochimiques.

Soutenue le 16 Novembre 1973.

JURY : MM. GERMAN Président
PERCHERON
Mle. QUERO Examinateurs
M. PILET Membre invité

UNIVERSITE PARIS-SUD

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE D'HYGIENE ET PROTECTION DE L'HOMME

ET DE SON ENVIRONNEMENT

Année 1973-1974 Série E. N° 9

THESE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE D'HYGIENE
ET PROTECTION DE L'HOMME ET DE SON ENVIRONNEMENT
DE L'UNIVERSITE PARIS - SUD
pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Yvonne **LE GARREC**

Titre de la Thèse :

VARIATION LISSE-RUGUEUSE chez BRUCELLA ABORTUS : quelques aspects immunologiques et immunochimiques.

Soutenue le 16 Novembre 1973.

JURY : MM. GERMAN Président
PERCHERON
Mle. QUERO Examinateurs
M. PILET Membre invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

PROFESSEURS

M. BAILLY Michel	Mathématiques
BINET Pierre	Parasitologie
BOUDENE Claude	Toxicologie
CAVE André	Matière Médicale
COHEN Yves	Pharmacodynamie
DIDRY Jean René	Mathématiques
COMBET-FARNOUX Claude	Chimie Organique
GERMAN Albert	Microbiologie
GOUNELLE Jean Claude	Physiologie
GUERNET Michel	Chimie Analytique
GUIGNARD J. Louis	Botanique
KHODADAD Parwiz	Chimie Générale et Minérale
LECLERC Maurice	Hématologie
PLAT Michel	Pharmacie Chimique
MANGEOT André	Pharmacie Galénique
MIOCQUE Marcel	Chimie Organique
PAOLETTI Claude	Chimie Biologique
Mme PLAT Monique	Législation Pharmaceutique
M. POISSON Jacques	Pharmacie Galénique
PUISIEUX Francis	Pharmacie Galénique
RENAULT Henri	Physique
REYNAUD Pierre	Pharmacie Chimique
WEPIERRE Jacques	Pharmacodynamie.

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

M. AGNERAY Jean	Chimie Biologique
BOURRINET Patrick	Hygiène
GEORGES	Parasitologie
HAMON Michel	Chimie Analytique
HAZEBROUCQ Georges	Physique
LAUGIER Raymond	Hydrologie
LEMONNIER Alain	Biochimie appliquée
MESTRE Jean Charles	Botanique
PARIS Michel	Matière Médicale
Mlle QUERO Anne Marie	Microbiologie
M. RODIER Noël	Chimie Générale
SOULEAU Charles	Chimie Générale et Minérale
MOSKOWITZ Henri	Chimie Organique.

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire
de la chaire de Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale
de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'ALFORT (Professeur CH. PILET)
grâce à l'aide de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

A mes Grand mères

A mes Parents

A ma Soeur, à mes Frères

A tous mes Amis.

A Monsieur A. GERMAN

Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
de Paris XI
Pharmacien des Hôpitaux

Qui a bien voulu accepter la présidence du jury de
cette thèse.

Très respectueusement.

A Monsieur F. PERCHERON

Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
de Paris V

Qui a bien voulu faire partie du jury de cette thèse
et qui nous a prodigué ses conseils dans le domaine
de la biochimie

Qu'il soit assuré de ma gratitude.

A Mademoiselle A.M. QUERO

Maître de Conférences à la Faculté des Sciences
Pharmaceutiques de Paris XI

Qui a bien voulu accepter de faire partie du jury de
cette thèse.

Qu'elle soit remerciée pour son accueil toujours chaleureux.

Monsieur CH. PILET

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Qui a été l'instigateur de ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

A Monsieur P. GORET

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
Membre de l'Académie de Médecine

Auprès duquel j'ai toujours trouvé un encouragement chaleureux.

Avec ma reconnaissance.

A tous les techniciens du Laboratoire de la Chaire de Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale, sans lesquels ce travail n'aurait pu être réalisé.

Qu'ils acceptent ici mes remerciements et mon amitié.

A tout le personnel du Laboratoire
qui a souvent été mis à contribution

Que chacun trouve ici mes remerciements.

VARIATION LISSE → RUGUEUSE CHEZ BRUCELLA ABORTUS :

QUELQUES ASPECTS IMMUNOLOGIQUES ET IMMUNOCHIMIQUES

P L A N

INTRODUCTION

CHAPITRE I - Variation Lisse (S) - Rugueuse (R) chez Brucella abortus et immunité spécifique

a) Mise au point d'un modèle expérimental

b) Etude cinétique de l'installation de l'immunité avec B19 S vivant ou inactivé et B19 R inactivé.

CHAPITRE II - Variation Lisse → Rugueuse et immunité non spécifique.

a) Modifications des cellules engagées dans les processus immunologiques et modification de la réponse aux globules rouges de mouton.

b) Modification de la réponse à l'infection à Klebsiella pneumoniae.

c) Modification de la réponse au virus de la Leucémie de Charlotte Friend.

CHAPITRE III - Approche immunologique et immunochimique du substrat de la variation Lisse - Rugueuse.

a) Par immunoélectrophorèse et hémagglutination passive

b) Par étude de la phase aqueuse de l'extrait selon Westphal.

CONCLUSION

INTRODUCTION

Brucella abortus est l'agent causal d'une maladie infectieuse, sévissant sur plusieurs espèces animales; cette bactérie à gram négatif, parasite intracellulaire facultatif, provoque notamment dans l'espèce bovine, l'avortement des femelles infectées; les germes alors excrétés sont responsables de la contagion. La brucellose est transmissible à l'homme et constitue une zoonose majeure.

La classification en trois espèces principales du genre Brucella a d'abord été fondée sur des constatations épidémiologiques puisque Brucella abortus est isolée dans l'espèce bovine, melitensis dans les espèces caprine et ovine et Brucella suis chez le porc; par la suite les critères biochimiques d'Huddleson (46) (résistance ou non à la fuchsine ou à la thionine) sont venus étayer cette classification. L'étude du métabolisme oxydatif réalisée par Meyer (74) a corroboré ces classifications. Les tentatives de classification sérologique se sont heurtées à des difficultés de deux ordres : les Brucella, même virulentes, ne sont pas toujours isolées en phase lisse, la structure même de la surface des Brucella en phase lisse. En 1932, Wilson et Miles (139) ont montré que les Brucella en phase lisse pouvaient être classées en deux groupes sérologiques, d'une part Brucella melitensis, de l'autre Brucella abortus et suis et ont conclu à la présence de deux antigènes de surface A et M partagés par les trois espèces mais dans des rapports différents, A étant majoritaire chez Brucella abortus et suis, M étant majoritaire chez Brucella melitensis. Par la suite, Renoux et Mahaffey (109) ont montré que les souches lisses possèderaient les antigènes A, M, Z et R, Brucella ovis (16) agent de l'épididymite du bélier faiblement agglutinée par les serums anti Brucella porterait Z et R et les souches rugueuses l'antigène R seulement. Il semble donc que dans le genre Brucella, comme dans le genre Salmonella où elle a été bien étudiée,

la variation génotypique de la surface puisse se faire à différents niveaux. On sait que pour les Salmonella, ces mutations portent sur des transférases, qui lorsqu'elles sont absentes aboutissent à des chaînes incomplètes par rapport aux longues chaînes porteuses des spécificités sérologiques lorsque le génome bactérien est complet. Mais alors que chez les Salmonella la classification sérologique a abouti à la définition de facteurs qui ont ensuite été définis chimiquement notamment grâce aux recherches de Staub et Westphal (119, 120) et qu'un grand nombre de mutations sont localisées sur le génome bactérien rien de tel n'a pu, à l'heure actuelle, être réalisé chez les Brucella.

Le phénomène de la variation lisse - rugueuse chez les Brucella présente un intérêt particulier dans le domaine vétérinaire où l'utilisation de vaccins non agglutonogènes est souhaitable en lieu et place des vaccins agglutinogènes comme celui préparé à partir de la souche B19 S avirulente de Cotton et Buck, en phase lisse (1932) (23); en effet l'induction d'agglutinines chez les animaux vaccinés interfère avec le dépistage sérologique de la maladie. L'utilisation des vaccins non agglutinogènes, préparés à partir de souches en phase rugueuse, inactivées en raison du risque de réversion in vivo s'est longtemps heurtée à la notion d'inefficacité d'une part des vaccins inactivés, d'autre part des vaccins à base de souches rugueuses dans la lutte contre les infections dues à des bactéries intracellulaires. Nous avons tenté de comparer l'efficacité du vaccin B19 S vivant tué et celle d'un vaccin inactivé préparé à partir d'un mutant Rough de B19 S; ceci après avoir mis au point un modèle expérimental.

Si les Brucella s'éloignent des entérobactéries par leur structure antigénique, elles se rapprochent par certain aspect des Mycobactéries. Comme ces dernières, elles possèdent la propriété d'induire des lésions de type granulome et un état d'hypersensibilité retardée. Or, les mycobactéries et en particulier le BCG se sont avérés être de puissants adjuvants systémiques c'est-à-dire des substances capables de modifier la réponse immunitaire de l'organisme comme l'ont montré Halpern et Coll. (1959) (40). L'utilisation de telles substances en vue de stimuler les défenses de l'organisme a déjà reçu des applications cliniques importantes notamment dans le cas du BCG qui a permis à Mathé et Coll. (73) d'améliorer considérablement la survie des malades porteurs de leucémies.

Pour ces raisons auxquelles s'ajoutent les travaux de Ramon et Richou (102) (103) sur les propriétés adjuvantes de Brucella abortus, des recherches ont été mises en oeuvre dans le laboratoire en vue de mettre en évidence une éventuelle activité immunostimulante de Brucella abortus inactivée. Notre contribution à ces recherches a porté sur la comparaison des propriétés des préparations obtenues à partir de B19 S et celles obtenues à partir de B19 R.

Enfin, nous avons tenté une approche biochimique de la variation lisse ⟶ rugueuse, chez Brucella abortus. L'isolement de l'antigène de surface pouvait, dans l'étude de l'immunité spécifique et non spécifique, permettre une approche plus précise des problèmes relatifs à la variation S ⟶ R.

L'exposé de nos travaux sur la variation lisse ⟶ rugueuse comprendra trois parties : la première ayant trait à l'immunité spécifique, la seconde à l'immunité non spécifique, la troisième relative à une tentative de mise en évidence de l'antigène responsable de la spécificité de la phase lisse de Brucella abortus.

CHAPITRE I

VARIATION LISSE ⟶ RUGUEUSE CHEZ BRUCELLA ABORTUS ET IMMUNITÉ SPÉCIFIQUE

La notion de prémunition dans l'immunité antibrucellique est apparue pendant longtemps comme un dogme et les qualités immunogènes de la souche B19 S ne sont plus à démontrer (38). Cependant, peu à peu s'est fait jour la notion d'une immunité vraie c'est-à-dire produite par injection de bactéries inactivées en phase lisse, puis, plus tard, en phase rugueuse.

En 1949, Stableforth (122) concluait que la comparaison entre vaccins vivants et tués, même adjuvés, chez le cobaye, était à l'avantage des vaccins vivants, tandis qu'en 1957, Mc Diarmid (69) puis en 1959 Pilet (92) montraient que la souche non agglutinogène 45/20 de Mc Ewen (70) inactivée et additionnée d'adjuvant huileux, conférait une immunité sensiblement égale à celle obtenue avec B19 S vivante.

Par ailleurs des fractionnements ont conduit Elwood et Coll. (29) à l'isolement d'un antigène à la fois agglutinogène et immunogène tandis que Rasooly et Coll. (104) ont extrait une fraction non agglutinogène et immunogène à partir du résidu de l'extraction des parois de Brucella abortus.

Cependant, le ou les véritables mécanismes impliqués dans l'un et l'autre cas n'ont pas été élucidés. Les faits que nous exposerons dans la deuxième partie de ce travail sur les propriétés immunostimulantes des Brucella, nous ont amené à penser que l'immunité induite par les vaccins inactivés pouvait s'expliquer par une augmentation des défenses non spécifiques de l'organisme.

Après avoir sélectionné un mutant rugueux à partir de la souche vaccinale B19 S, nous avons voulu étudier son pouvoir immunogène chez la souris. Nous avons pensé que l'étude de la cinétique de l'installation de l'immunité antibrucellique faite comparativement après vaccination par B19 S vivante, B19 S inactivée, B19 R inactivée, pouvait mettre en évidence des différences, d'une part entre prémunition et immunité vraie, d'autre part entre vaccin inactivé en phase S et vaccin inactivé en phase R. Bien que nous n'ayons pas observé de réversion in vivo, la souche B19 R a été utilisée seulement sous sa forme inactivée. Une épreuve par Listeria monocytogenes à la suite des mêmes vaccins devait permettre de tester l'aspect non spécifique puisqu'il s'agit également d'une bactérie intracellulaire.

Mais le contrôle et la mise au point de nouveaux vaccins en matière de brucellose, se heurtent à une grande difficulté, l'absence d'un animal de laboratoire susceptible de reproduire la maladie naturelle des bovins. Or, l'expérimentation sur bovins ne peut, étant donné son coût, être envisagée d'emblée lorsqu'il s'agit d'expérimenter de nouveaux vaccins.

Bien que la maladie naturelle soit caractérisée par la chronicité, en dehors du phénomène particulier de l'avortement chez la femelle, certains auteurs ont tenté de prendre pour critère de contrôle la protection contre l'effet léthal qui peut résulter de l'introduction d'un très grand nombre de germes chez l'animal d'expérience (64) ou de l'adjonction de mucine, comme l'avaient préconisé Jacotot et Vallée (48) (49) pour le rat et la souris. Mais cette invasion massive de l'organisme qui représente plus une toxi-infection qu'une infection véritable et franchit d'emblée toutes les barrières, ne semble pas devoir être retenue comme moyen d'investigation. Nous avons choisi de contrôler le degré de l'infection chez les animaux de laboratoire après une épreuve virulente par Brucella abortus 544, souche d'épreuve standard préconisée par une commission d'experts réunie sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé en 1953. Mais si Smith et Fabyan (121) avaient montré depuis longtemps la réceptivité du cobaye en vue du diagnostic de la maladie, il semble que peu d'études systématiques aient été entreprises quant à la sensibilité du cobaye à Brucella abortus en vue de l'utilisation de cet animal dans le contrôle des vaccins.

Olitzki (88) le premier a tenté d'établir la DI 50 d'une souche de Brucella abortus pour la souris blanche. Ses travaux concluaient que la DI 50 n'indique nullement le degré d'infection qui peut être très variable d'un animal à l'autre.

Notre travail personnel dans ce domaine a comporté deux étapes, la première étant le choix de l'espèce animale avec mise au point des modalités, puis l'espèce murine ayant été retenue, la seconde étape a consisté à comparer entre elles plusieurs lignées pures de souris.

Nous avons tout d'abord tenté d'établir la DI 50 de la souche 544 pour trois espèces, le cobaye, le rat, la souris; puis nous avons cherché à comparer la cinétique de la réponse à l'infection. Au cours de cette recherche nous avons été amené à apporter des améliorations techniques : la situation intracellulaire des Brucella rend leur libéraiton parfois difficile; il importait d'automatiser le broyage sans aboutir à une inactivation des germes. D'autre part, la nécessité vite apparue, du traitement individuel des animaux rendait souhaitable l'étalement dans le temps du broyage et de l'ensemencement des organes prélevés à un moment donné. Nous avons choisi d'étudier l'effet de la conservation des organes, de 24 heures ou 7 jours à + 4°C et - 25°C. Ce travail a fait l'objet de trois publications (94) (95) (96).

Nous avons pensé que la variabilité observée dans la réponse de la souris Swiss CDI pouvait être due au fait qu'il ne s'agit pas d'une lignée pure et que le génotype pouvait déterminer la sensibilité ou la résistance à Brucella abortus. Dans le but de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons choisi de comparer les réponses de diversee lignées pures et d'un hybride de première génération, dont les deux souches parentales étaient également étudiées, à celle de la souris Swiss CDI.

La mise au point du modèle expérimental a été longue et constitue en fait l'essentiel du travail relatif à l'étude de l'immunité spécifique qui n'a été possible qu'à partir du moment où nous possédions une technique de contrôle valable.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

La souche d'épreuve retenue a été Brucella abortus 544 (Weybridge), souche CO2 dépendante, conservée lyophylisée.

La souche vaccinale B19 S de Cotton et Buck, entretenue sur Albimi Agar, est la souche du Département Agriculture des U.S.A. (U.S.D.A.), qui voit sa multiplication complètement inhibée par l'érythritol; elle n'est donc pas retrouvée lors du sacrifice des animaux, lorsque les ensemencements sont faits sur gélose albimi contenant 0,1 pour cent d'érythritol. En effet, comme l'ont montré Jones et Coll. (51) les souches virulentes telle Brucella abortus 544 ne sont pas inhibées en présence d'une telle concentration de ce sucre en C4.

- Obtention du mutant en phase rugueuse à partir de B19 S : n'ayant pu vérifier avec la B19 S l'observation de Braun et Ciaccio (14) selon laquelle la D Alanine exerçait une pression de sélection en inhibant la multiplication des formes lisses (la croissance de B19 S n'était pas inhibée par des concentrations de D alanine allant jusqu'à 6 mg/ml), nous avons choisi un autre mode de sélection, à savoir le passage en milieu liquide non aéré (37) : une colonie B19 S a été ensemencée en bouillon Albimi, après 48 H. on a réalisé l'étalement sur gélose albimi et recherché une colonie d'aspect rugueux par l'éclairage selon Henry en lumière oblique réfléchie (43). La pureté de la souche a été contrôlée par étalements successifs. La souche ainsi obtenue présente toutes les caractéristiques des souches rugueuses de Brucella :

- autoagglutinabilité en ClNa à 8,5 pour mille.

- agglutinabilité par l'acriflavine à un pour mille selon Braun (13)

- coloration en bleu-rouge par le cristal violet selon White et Wilson (138)

Aucune forme S n'a pu être détectée après passage durant 15 jours chez la souris. L'injection de 10^9 germes par voie sous-cutanée, en adjuvant incomplet de Freund, n'a pas produit d'agglutinines chez la souris. Cette souche est désignée comme B19 R.

Les germes B19 S et B19 R ont été inactivés par la chaleur à 65°C pendant 1 heure.

- Les cobayes étaient de race Hartley.

- Les rats blancs étaient de race Wistar

- Les souris Swiss CDI provenaient de l'élevage Charles Rivers.*

- Les lignées pures C3H, CBA, DBA2, C57 BL6, de même que l'hybride FI (C57BL6 X DBA2) provenaient du Centre de sélection des animaux de laboratoire.**

- L'hybride F1 a été utilisé dans l'étude de l'installation de l'immunité car nous n'étions pas en possession des conclusions d'ordre génétique dont nous ferons état.

- Les animaux étaient âgés de 3 à 4 mois au moment de l'épreuve virulente lors de la mise au point du modèle expérimental, ceci représente l'âge habituel des animaux de laboratoire lors du contrôle d'efficacité des vaccins après un mois d'immunisation, et de 2 à 3 mois au début de l'expérimentation sur la cinétique de l'immunité.

- Les doses d'épreuve sont indiquées pour chaque essai. Dans l'étude comparative des lignées pures et de la CDI nous avons fait varier progressivement la dose.

* Elbeuf
** C.N.R.S. ORLEANS la Source

- les vaccinations ont été réalisées par voie sous-cutanée. L'immunisation a duré de 5 jours à 60 jours. La quantité de germes B19 S vivants injectés a toujours été de l'ordre de 1 à 5 10^6 germes, celle des germes tués de 500 ug poids sec.

- Le broyage manuel était effectué au mortier, en présence de sable de Fontainebleau.

- Le broyage mécanique était réalisé à l'aide de l'appareil Ultra Turrax *, pendant 2'.

- Pour le broyage, chaque rate était placée dans 10 ml de bouillon Albimi : une quantité aliquote de la suspension et de ses dilutions au 1/10, 1/100, 1/1000 était ensemencée sur gélose Albimi.

- Les numérations étaient effectuées après 48 à 72 heures d'incubation à 37°C en présence de 5 % de CO2.

Lors des études sur les vaccins en phase lisse ou rugueuse, le sacrifice des animaux, après épreuve virulente (2 doses ont été utilisées) par Brucella abortus 544 a été réalisé au IIème jour en tenant compte des résultats obtenus dans la mise au point du modèle expérimental. Seul le broyage mécanique a été utilisé. Les rates des animaux vaccinés à l'aide de B19 S vivant ont été ensemencées sur gélose albimi à l'érythritol afin d'inhiber la culture de la souche vaccinale.

Le test non paramétrique de Mann et Whitney (72) a été utilisé en vue de l'analyse stratistique des résultats.

* Paris-Labo.

RÉSULTATS :

I - Choix de l'espèce animale, étude de différentes lignées de souris.

L'essai d'établissement de la DL 50 de Brucella abortus 544 au 10ème jour chez la souris, le rat, le cobaye (Tableau 1) n'a pu permettre de fixer avec précision cette DL 50. Ceci est dû à une grande variabilité individuelle. Cependant les cent pour cent d'infection ont été atteints plus rapidement chez la souris. Les tableaux 2, 3, 4 et la figure 1, relatifs à l'établissement de la cinétique de l'infection dans les trois espèces montrent que le degré d'infection décroît très rapidement chez la souris tandis que, chez le cobaye l'infection splénique, peu nette dans la phase initiale, se maintient à un niveau stable jusqu'au 70ème jour (l'observation n'a pas été poussée plus loin dans le temps).

L'étude de la dispersion du nombre des Brucella dans la rate de la souris CD1 après une dose infectante à cent pour cent, montre que les distributions s'étendent sur 5 logarithmes (tableau 5).

Dans les deux séries d'essais (tableau 6) réalisées en vue de la comparaison du broyage mécanique et manuel, le nombre moyen des colonies pour des lots comportant 40 animaux pour la 1ère série, 35 pour la seconde, a toujours été plus élevé avec le broyage mécanique. Cependant, seul le second essai a fait apparaître une différence significative entre les deux méthodes, lors de l'analyse statistique.

Enfin le test de Mann et Whitney, n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les lots de rates conservées à + 4°C ou - 25°C et les lots broyés immédiatement. Ceci montre que la conservation des Brucella est satisfaisante pendant au moins 7 jours à ces températures (tableau 7).

TABLEAU I

Essai d'établissement de la DI 50 de Brucella abortus 544 chez la souris, le rat, le cobaye, après injection intrapéritonéale

	Pourcentage d'animaux infectés		
Nombre de germes injectés	Souris CD I	Rat Wistar	Cobaye Hartley
25	20	60	0
50	80	40	40
100	60	100	60
200	80	80	100
400	60	80	80
800	100	100	100
1600	80	100	100
3200	60	40	80
6400	100	80	100
12800	80	100	80
25600	80	100	60
51200	100	80	100

TABLEAU II

Résultats des essais sur souris

Sacrifice aux jours indiqués après l'épreuve	Mélange de 3 rates Moyenne obtenue sur 3 boîtes de Pétri	Mélange de 3 rates Moyenne obtenue sur 3 boîtes de Pétri	Moyenne (Inoculum : 0,1 ml)
1er essai. Dose d'épreuve : 9.000 à 10.000 germes			
4	1.345	1.950	1.647
6	3.000	400	1.700
7	993	2.500	1.746
10	2.500	1.061	1.775
12	454	3.800	2.127
17	2.900	285	1.592
20	729	1.880	1.304
24	844	620	732
28	221	480	350
32	881	63	472
39	56	80	68
2ème essai. Dose d'épreuve : 12.000 germes			
3	1.032	434	733
5	3.000	1.585	2.292
7	1.851	2.500	2.175
10	5.000	2.500	3.750
12	2.500	5.000	3.750
14	2.009	1.265	1.637
17	3.250	2.250	2.750
20	1.215	2.302	1.758
24	662	487	574
28	403	1.428	915
32	306	590	448
3ème essai. Dose d'épreuve : 10.000 germes			
1	119	147	133
4	331	215	273
6	1.700	1.800	1.750
8	1.514	2.256	1.885
11	2.350	1.480	1.915
13	3.000	1.304	1.152
15	2.500	3.000	2.750
20	969	959	964
25	518	655	636
28	157	124	140
33	584	Morts	584

TABLEAU III

Résultats des essais sur rats

Sacrifice aux jours indiqués après l'épreuve	Mélange de 3 rates Moyenne obtenue sur 3 boîtes de Pétri	Mélange de 3 rates Moyenne obtenue sur 3 boîtes de Pétri	Moyenne (Inoculum : 0,2 ml)
4ème essai. Dose d'épreuve : 10.980 germes, broyage mécanique à l'Ultra-Turrax			
3	210	600	400
7	543	220	381
10	4	309	156
13	199	131	165
20	91	31	61
24	28	46	37
30	6	7	6,5
5ème essai. Dose d'épreuve : 14.000 germes, broyage mécanique à l'Ultra-Turrax			
3	74	254	169
7	1.340	1.218	1.279
10	856	741	798
14	834	620	727
17	810	1.100	955
21	391	343	367
25	14	24	19
29	16	14	15
6ème essai. Dose d'épreuve : 9.270 germes, broyage mécanique à l'Ultra-Turrax			
4	-	228	228
7	1.000	176	588
12	864	628	744
14	740	504	620
18	520	444	288
22	112	732	424
30	-	1	1

TABLEAU IV

Résultats des essais sur cobayes

Sacrifices aux jours indiqués après l'épreuve	Mélange de 2 rates Moyenne obtenue sur 3 boîtes de Pétri	Mélange de 2 rates Moyenne obtenue sur 3 boîtes de Pétri	Moyenne (Inoculum : 0,2 ml)
1er essai. Dose d'épreuve : 9.000 à 10.000 germes. Inoculation par voie intrapéritonéale			
4	42	0,3	21
6	0	40,6	20
7	6	0	3
10	0	70	35
12	0,3	10	5
20	16	51	33
28	3	0,6	1,6
35	1.113	167	640
45	218	273	245
53	736	476	606
61	31	380	180
70	229	544	386
2ème essai. Dose d'épreuve : 12.000 germes. Inoculation par voie intrapéritonéale			
3	26	32	29
5	9	41	25
7	0	0	0
10	63	2	32
12	1	65	33
14	87	0	44
20	39	114	76
28	130	273	202
35	139	21	80
42	20	2.500	1.258
52	361	-	361
59	1.245	-	1.245
3ème essai. Dose d'épreuve : 10.000 germes. Inoculation par voie intrapéritonéale			
1	1	15	8
4	61	16	38
6	1	0	0,5
8	159	57	108
11	5	40	22,5
13	0	1,6	0,8
20	1.008	1.018	1.013
28	162	167	164,5
35	834	173	503,5
43	250	-	250
53	-	-	-

Figure 1: CINETIQUE de l'INFECTION après INJECTION INTRAPERITONEALE de BRUCELLA ABORTUS 544 à la SOURIS (12000 germes) auRRAT $14000 germes),au COBAYE (12000 germes).

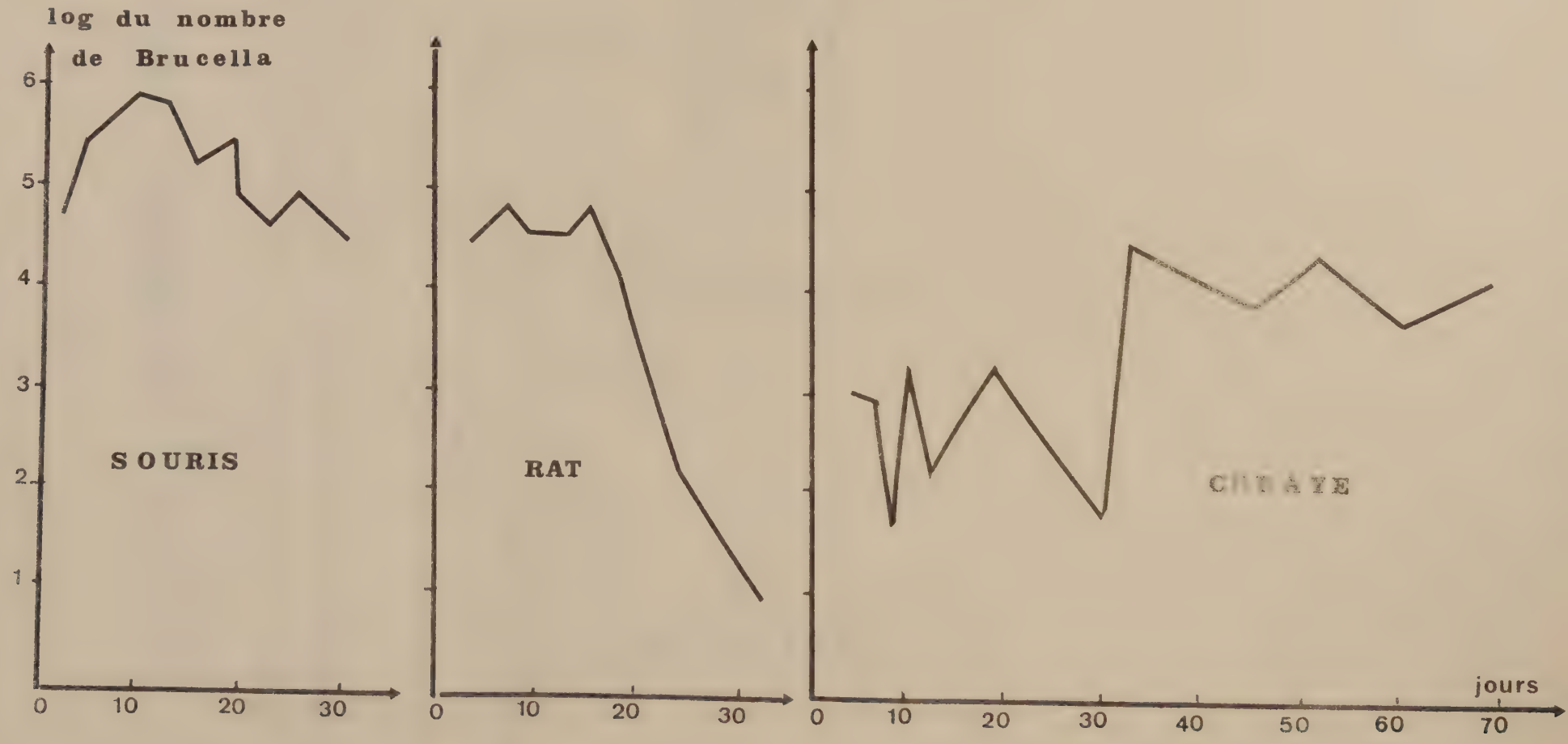


TABLEAU V

Etude de la dispersion lors de l'ensemencement de rates isolées (broyage mécanique)
Les chiffres obtenus ont été " ordonnés " en vue de l'application du test de Mann et Whitney

Résultats	Epreuve	
	1ère série d'essais 12.870 bactéries	2ème série d'essais 11.190 bactéries
Moyenne des numérations effectuées sur 3 boîtes de Pétri à partir des rates isolées (broyage mécanique)	17 30 63 80 397 500 856 931 1.000 1.200 1.275 1.400 3.000	5 19 110 163 173 184 196 454 818 885 1.000 1.200

TABLEAU VI

Broyage mécanique et broyage manuel. Comparaison des résultats
Les chiffres obtenus ont été " ordonnés " en vue de l'application du test de Mann et Whitney

Résultats	Epreuve			
	1ère série d'essais 12.870 bactéries		2ème série d'essais 11.940 bactéries	
	Broyage			
	mécanique	manuel	mécanique	manuel
Moyenne des numérations sur 3 boîtes de Pétri, correspondant à un groupe de 5 rates (Ensemencement: 0,1 ml)	92	58	750	284
	326	171	818	401
	439	330	890	446
	444	376	975	521
	981	399	1.020	532
	1.300	662	1.100	627
	1.450	695	1.450	868
	1.500	900		
Médiane	816	448	876	459

TABLEAU VII

1er essai d'une série de 3 essais : Influence de la température sur la conservation des Brucella

Lot N°	Rates ensemencées	Nombre de colonies										
		Numéros des animaux										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	M
I	le jour du sacrifice	29	9	4	4	21	332	1020	444	+	644	250
II	après 24 H. à -4°C	498	533	650	312	320	1081	450	632	325	481	529
III	après 24 H. à -25°C	541	439	379	606	154	588	657	X	474	X	479
IV	après 7 jours à + 4°C	3	X	8	384	72	418	43	372	352	328	220
V	après 7 jours à -25°C	7	49	4	9	350	423	535	314	203	X	210

Légende : M = Médiane
X = contamination

Les schémas 2 à 6 donnent un aperçu des distributions du nombre des Brucella retrouvées dans la rate après 7 et 11 jours d'infection. Le fait le plus notable est que deux lignées, la lignée DBA2 et la lignée CBA, présentent des distributions resserrées vers la droite, donc une plus grande homogénéité et une plus grande sensibilité. Les lignées C3H et C57Blo se sont montrées régulièrement moins sensibles avec des réponses dispersées. La souche Swiss CDI a donné les réponses les plus hétérogènes.

De plus, il apparaît que les distributions se déplacent sensiblement vers la droite lorsque l'inoculum passe de 25.000 à 30.000 puis à 45.000 germes, mais on ne note pas une progression importante de l'infection entre le 7ème et le 11ème jour.

Figure 2: DISTRIBUTION du NOMBRE des BRUCELLA ABORTUS 544 retrouvées dans la RATE des LIGNEES PURES C3H,CBA,DBA2,C57B16,l'HYBRIDE (C57B16xDBA2),et la SOUCHE CD1 au 7ème jour après l'injection intrapéritonéale de 25000 germes.

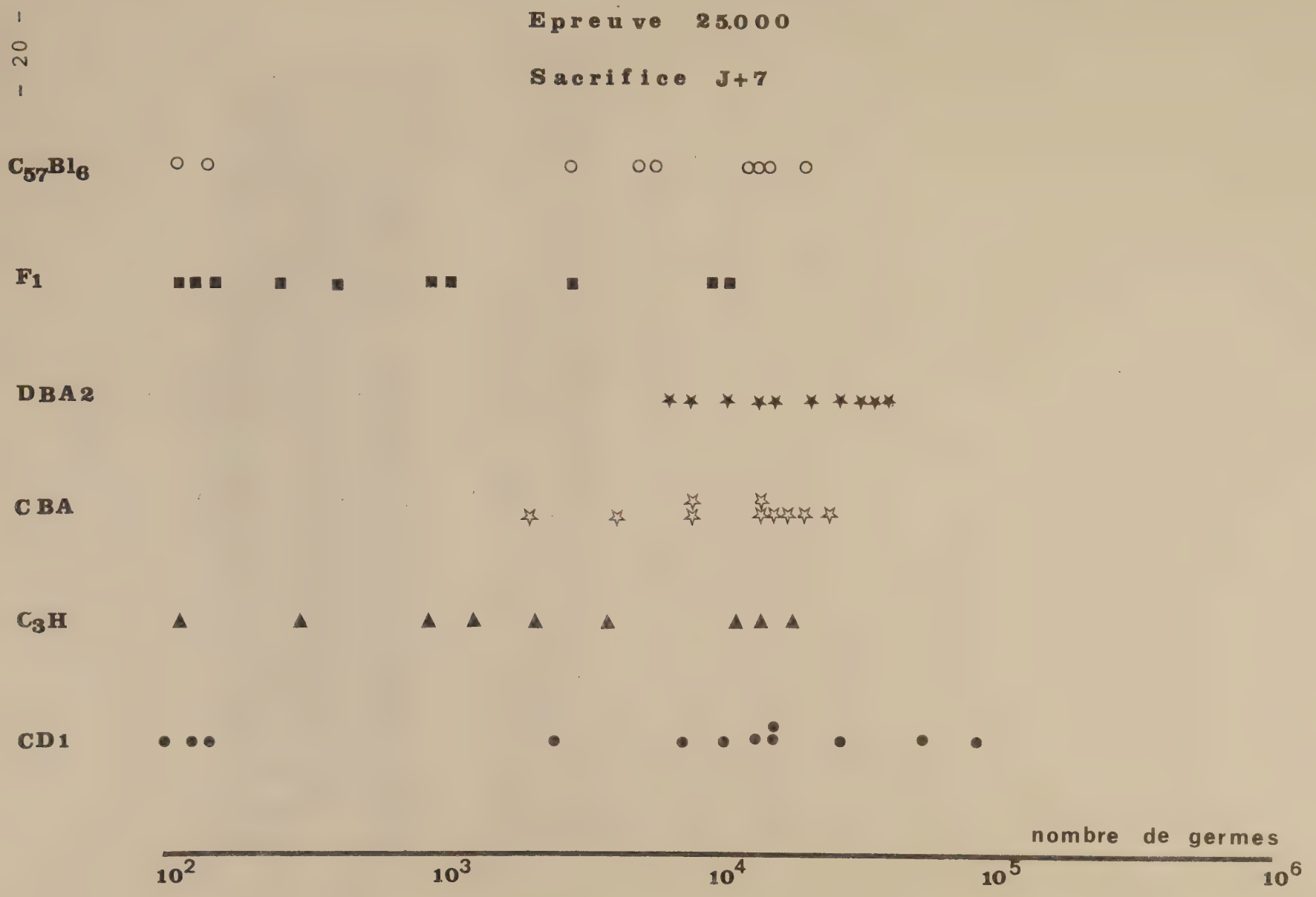


Figure 3: DISTRIBUTION du NOMBRE des BRUCELLA ABORTUS 544 retrouvées dans la RATE des LIGNEES PURES C3H,CBA,DBA2,C57Bl6,l'HYBRIDE(C57Bl6xDBA2),et la SOUCHE CDl au 7ème jour après l'injection intrapéritonéale de 31000 germes

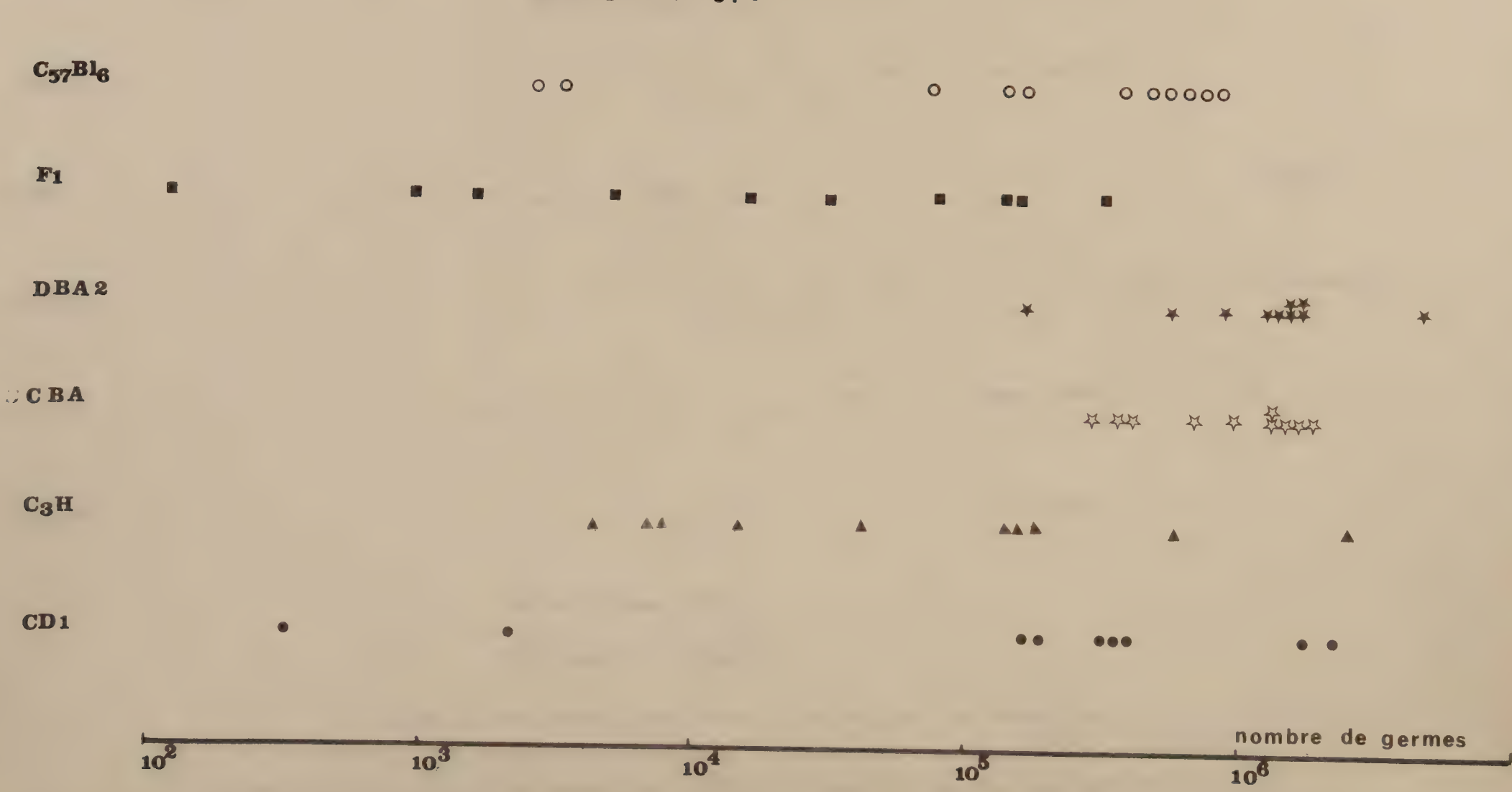


Figure4: DISTRIBUTION du NOMBRE des BRUCELLA ABORTUS 544 retrouvées dans la RATE pour les LIGNEES PURES C3H,CBA, DBA2,C57Bl6,L'HYBRIDE (C57Bl6xDBA2) et la SOUCHE CDIau lléme jour après l'injection intrapéritonéale de 31000 germes.

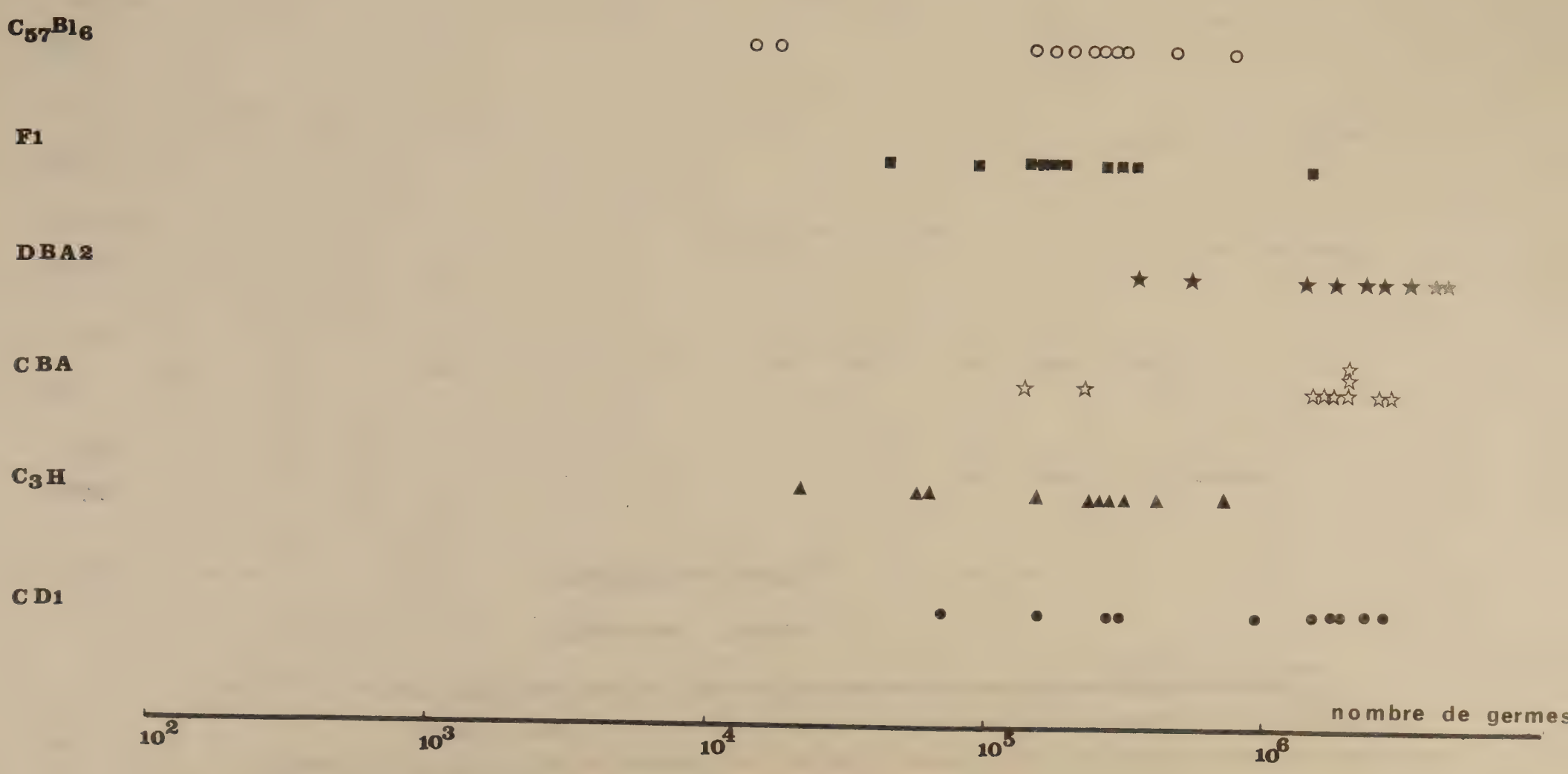


Figure 5:DISTRIBUTION du NOMBRE des BRUCELLA ABORTUS 544 retrouvées dans la RATE des LIGNEES PURES CBA,DBA2,C57Bl6,de l'HYBRIDE(C57Bl6xDBA2) et de la SOUCHE CDl au 7ème jour après l'injection intrapéritonéale de 45000 germes.

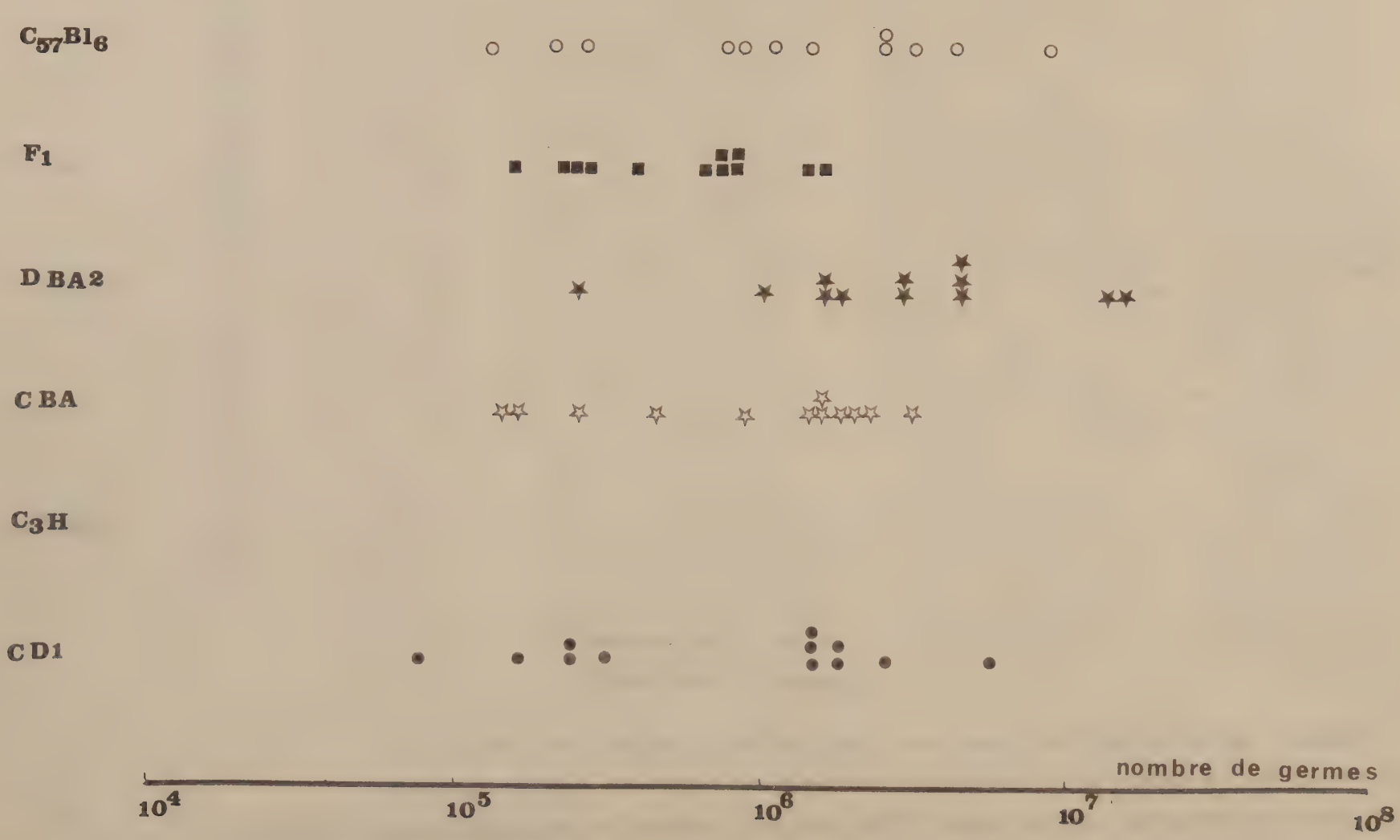
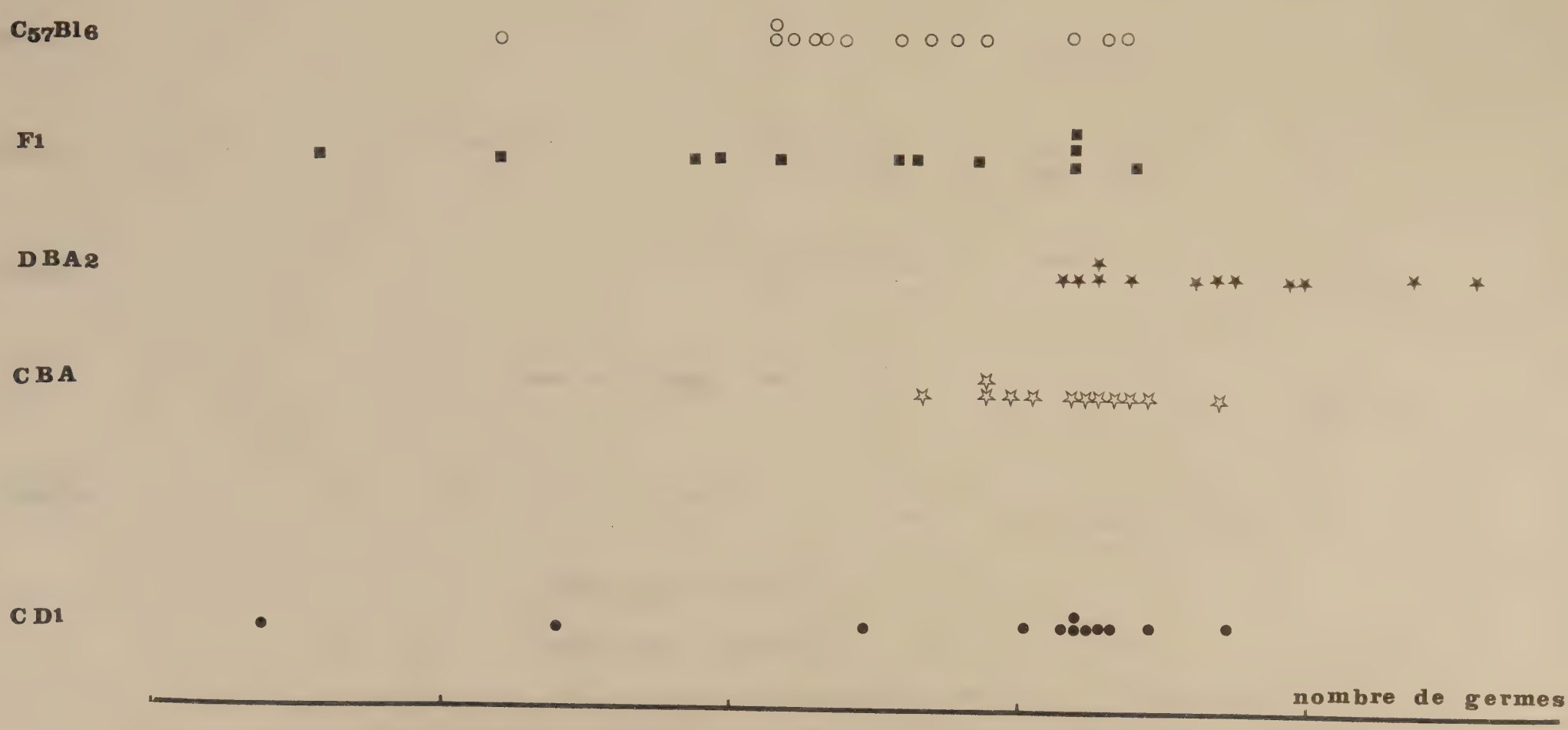


Figure 6: DISTRIBUTION du NOMBRE des BRUCELLA ABORTUS 544 retrouvées dans la RATE des LIGNEES PURES CBA,DBA2,C57B16,de l'HYBRIDE(C57B16xDBA2),et de la SOUCHE CD1 au 11ème jour après l'injection intrapéritonéale de 45000 germes.



II - Etude de la cinétique de l'installation de l'immunité avec B19 S vivant ou tué et B19 R tué.

Les résultats relatifs au contrôle de la vaccination après injection de B19 S vivant ou tué de B19 R tué sont présentés dans les tableaux 8 et 9, l'un correspondant à l'épreuve par 42.000 germes, l'autre par 72.000 germes. Ce type d'expérience ayant été renouvelé 3 fois a toujours permis d'aboutir aux mêmes conclusions.

Il apparaît que l'immunité induite par la souche vaccinale B19 S utilisée vivante se fait progressivement et reste encore très faible au 5ème jour tandis qu'à partir de 10ème jour elle atteint son niveau maximal et ceci pour les deux épreuves utilisées et que ce niveau ne décroît pas jusqu'au 60ème jour. En ce qui concerne la souche B19 S inactivée, un bon niveau d'immunité est atteint dès le 5ème jour, supérieur pour les deux doses d'épreuve à ce qu'il est avec B19 S vivant. Le niveau paraît maximal après 20 jours d'immunisation mais semble décroître vers le 60ème jour lorsqu'on considère la dose d'épreuve la plus élevée.

Pour ce qui est de la souche B19 R, elle produit un certain degré d'immunité après 5 jours mais il faut noter que cette immunité résiste mal à l'augmentation de la dose d'épreuve; par la suite la différence avec les témoins reste toujours significative mais le niveau de l'immunité est toujours inférieur à celui produit par la souche B19 S. Le niveau de l'immunité, observé au 60ème jour de vaccination ne diminue pas dans le cas de B19 S vivant, avec l'épreuve la plus élevée, tandis que dans le cas de B19 S inactivé on note une baisse sensible.

Une expérience analogue réalisée chez la souris DBA 2 n'a pas permis de protéger les animaux contre l'infection par 13,000 germes d'une souche virulente de Listeria monocytogenes injectés par voie intraveineuse. Cependant après inoculation de B19 S vivant et tué au jour -3 on a noté une chute rapide du nombre des germes retrouvés dans la rate au 5ème jour alors qu'au 3ème jour aucune protection n'était apparue.

TABLEAU VIII

Cinétique de l'installation de l'immunité induite par B19 S vivante, B19 S inactivée, vis-à-vis de Brucella abortus 544 (42.000 germes)

Vaccins	Nombre de germes retrouvés dans la rate après l'épreuve virulente						
	J 5	J 10	J 20	J 30	J 40	J 60	TEMOINS
B19 S vivant 10^6	$1,75.10^3$	0	0	0	0	0	
	2,45	0	0	0	0	0	
	2,5	0	0	0	0	0	
	3,4	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	$0,5.10^2$	0	0	$1,5.10^4$
	7,2	2.10^2	0	0,5	0	$1,10^2$	2,2
	$1,1.10^6$	$2,5.10^2$	0	1	0	1,5	$1,14.10^5$
B19 S tué 500 ug	0	0	0	0	0	0	1,15
	0	0	0	0	0	0	1,9
	0	$0,5.10^2$	1.10^2	0	0	$0,5.10^2$	2,75
	$0,5.10^2$	0,5	1	$1,10^2$	$1,5.10^2$	1	3,1
	2,5	1	1	1	1,5	1	3,3
	$2,2.10^3$	$1,5.10^3$	1,5	2,5	3,5	2	3,8
	1.10^4	2	8	$4,2.10^3$	5	$1,1;10^3$	4,45
B19 R tué 500 ug	0	0	$1,5.10^2$	0	0	0	6,05
	0	0	4	0	0	0	8,4
	0	$2,95.10^3$	7,5	0	0	$0,5.10^2$	
	0	$7,4.10^4$	7,5	0	$3,7.10^4$	1	
	0	$1,23.10^5$	$6,75.10^4$	$1,3.10^3$	7;25	1	
	0	2,35	8,5	8	$1,3.10^5$	2,5	
	$4,10^2$	2,80	$3,75.10^5$	9.10^4	2,7	$2,4.10^5$	Epreuve 42,000

TABLEAU IX

Cinétique de l'installation de l'immunité induite par B19 S vivante, B19 S inactivée, vis-à-vis de Brucella abortus 544
(72,000 germes)

Vaccins	Nombre de germes retrouvés dans la rate après l'épreuve virulente						
	J 5	J 10	J 20	J 30	J 40	J 60	TEMOIN
B19 S vivante 10^6	1.10^2	0	0	0	0	0	
	3,2	0	0	0	0	0	
	$3,6x10^3$	0	0	0	0	0	
	$6,5x10^3$	0,5	0	0	0	0	4.10^4
	$7,2x10^4$	1	$0,5x10^2$	0	$0,5x10^2$	0	$1,3.10^5$
	1,35	1	5,5	$0,5x10^2$	0,5	1.10^2	3,2
	$3,5x10^5$	2.10^2	7,5	1,5	0,5	1.10^2	3,95
B19 S tuée 500 ug	0	0	0	0	0	$1,8.10^2$	4,2
	0	0	0	$0,5.10^2$	0	2,1	4,5
	0	$0,5x10^2$	0	0,5	$1x10^2$	2,5	4,5
	0	1	0	1,5	4	3,5	5,5
	0	2	0	2,5	5	6	5,8
	10^2	8	0	2,5	6	4.10^3	9,5
	10^2	14	0	2,5	$4x10^3$	$5,5.10^4$	$1,1.10^6$
B19 R tuée 500 ug	0	$1,3x10^3$	$1,5.10^4$	$1,3.10^4$	0	$1,5.10^2$	1,15
	1,5	$5x10^4$	3	3,1	$3,5x10^2$	$1,5.10^3$	1,3
	$1,8x10^3$	6,5	7	5	$2,4x10^3$	$9,5.10^3$	7,5
	2,3	$1,2x10^5$	$1,2x10^5$	$1,5?10^5$	4,3	$2,9.10^4$	
	2,5	1,5	1,5	1,55	$1,85.10^4$	6.10^4	Epreuve =
	3,7	1,5	2	4,37	$1,1.10^5$	6,5	72.000
	$4,5x10^5$	2,5	3	6,4	$3,65.10^5$	$1,75.10^5$	Brucella abortus 544

DISCUSSION

L'essai d'établissement de la DL 50 de Brucella abortus a mis en évidence la grande variabilité des réponses individuelles à Brucella abortus 544. Le rat et le cobaye sont apparus comme moins sensibles que la souris avec une plus grande héterogénéité. CARRERE et Coll. (18) avaient déjà constaté que le rat blanc est beaucoup moins sensible à Brucella abortus qu'à Brucella melitensis et B. suis. Le cobaye, considéré comme un animal très sensible à Brucella melitensis (STABLEFORTH, 123), RENOUX (108) paraît l'être beaucoup moins à Brucella abortus.

Pour ces raisons nous avons pensé qu'il était préférable d'utiliser la souris en vue du contrôle ou de la mise au point des vaccins devant protéger contre Brucella abortus. Ce choix impose un sacrifice relativement précoce après l'infection : entre le 7ème et le 11ème jour, période qui avait déjà été préconisée par de ROPP (110). Par contre, OLITZKI (88) et RASOOLY (104) utilisant Brucella abortus 2308 dont la virulence semble plus élevée que celle de la 544, constatent une persistance des germes pendant huit semaines chez la souris, après inoculation intrapéritonéale de 3000 germes; ils notent de très grandes variations individuelles.

Le broyage individuel des rates ne peut qu'améliorer l'information et permet un traitement statistique des résultats. A cet égard, l'utilisation d'un test ne nécessitant aucune hypothèse de normalité pour la distribution nous paraît préférable au test de t de Student-Fischer.

La comparaison du broyage mécanique et du broyage manuel a pu être faite en utilisant le test de Mann et Whitney car elle a porté sur au moins 7 groupes de 5 souris dans chaque lot mis en expérience. Cette comparaison est à l'avantage du broyage mécanique qui fait disparaître le caractère aléatoire du broyage manuel, sans diminuer le nombre des Brucella libérées.

Les résultats obtenus après conservation au froid vont à l'encontre des conclusions de Renoux (109) selon lesquelles le stockage à - 25°C permettrait la libération d'un nombre plus important de Brucella, comme Gray et Coll. (39) l'avaient démontré pour Listeria monocytogenes.

Les réponses de différentes lignées à l'infection par Brucella abortus 544 injectée par voie intrapéritonéale, montrent clairement que la sensibilité de la souris à l'infection brucellique est génétiquement déterminée.

Asakawa (4) avait déjà noté des différences dans la réponse de diverses lignées à Brucella abortus A62.

Il ne semble pas exister de relation entre la sensibilité à Brucella abortus et l'antigène d'histo-compatibilité puisque les lignées CBA et C3H, toutes deux porteuses de l'antigène H2k, répondent de manière très différente; l'utilisation de lignées coisogéniques pourrait apporter une réponse définitive sur ce point.

L'étude génétique par " croisement en retour " n'a pas été entreprise et il est possible que plusieurs gènes entrent en jeu. Le croisement C57 B16 X DBA2 a montré une codominance de la sensibilité et de la résistance.

Si les différences de sensibilité semblent s'estomper avec les doses élevées, l'utilisation de doses trop élevées ne paraît pas devoir être retenue car elles réalisent une inondation del'organisme qui peut écraser la résistance des animaux alors qu'avec des doses moyennes mais infectantes à cent pour cent, on se rapproche davantage des conditions de la maladie naturelle.

L'étude de la cinétique de la réponse dans les lignées les plus sensibles, comme la DBA2 et la CBA devra être poursuivie au delà du 11ème jour. En effet, si ces lignées n'éliminent pas Brucella abortus 544 aussi rapidement que la souche CDI, il deviendrait possible de réaliser

le sacrifice des animaux beaucoup plus tard après l'épreuve infectante comme cela est préconisé par la Pharmacopée Vétérinaire anglaise avec le cobaye comme animal d'expérience. (Codex Vétérinaire Anglais Supplément 1970).

Dans le système que nous avons utilisé la souche B19 S s'est montrée très efficace dans l'induction de l'immunité; l'immunité de prémunition apparaît plus tardivement que l'immunité induite par B19 S inactivée mais résiste mieux à l'augmentation de la dose d'épreuve. Enfin la souche B19 R inactivée est capable d'induire une certaine résistance à l'infection mais celle-ci est nettement inférieure à celle induite par B19 S inactivée et ne semble pas devoir résister à l'augmentation de la dose d'épreuve.

Il est préférable que des mécanismes différents entrent en jeu dans l'immunité induite par la souche vaccinale B19 S vivante et celle produite par les préparations inactivées de B19 S et B19 R. En outre ces résultats montrent qu'il n'est pas impossible que les anticorps de surface jouent un rôle puisque comme l'a montré Shrigley (120) les Brucella sont sensibles à l'action du complément en présence d'anticorps spécifiques.

Cependant il semble que des modifications sur l'arc afférent de l'immunité, soit par utilisation d'adjuvants huileux souvent utilisés dans la vaccination par les vaccins tués en phase rugueuse, soit par utilisation de préparations du type PB proposé par Pilet et Bonneau (93) (11), où les sites agglutinogènes sont recouverts d'anticorps spécifiques qui pourraient agir en favorisant la captation par les macrophages, tout en présentant l'avantage d'inhiber la synthèse ultérieure des agglutinines, puissent permettre d'induire un état de résistance élevée avec les bactéries inactivées en phase lisse ou rugueuse. Ainsi Jones et Berman (52) ont montré récemment que chez le cobaye, à la 20ème semaine de la vaccination, la protection offerte par les vaccins adjuvés en phase lisse ou rugueuse était équivalente à celle induite par B19 S vivant, parallèlement ils ont pu mettre en évidence l'hypersensibilité retardée qui était absente chez les animaux recevant des vaccins inactivés sans adjuvant. En ce qui nous concerne, dans aucun des cas, nous n'avons pu mettre en évidence l'hypersensibilité retardée à la mélitine.

Les résultats obtenus dans l'essai de protection contre Listeria monocytogenes, diffèrent de ceux obtenus par Mackaness (66) puisque cet auteur a observé une phase de résistance entre le 17ème et le 35ème jour après l'injection de B19 S vivantes mais celles-ci étaient administrées par voie intraveineuse. Alors que dans l'expérience de Mackaness le nombre de germes B19 S croît dans la rate jusqu'au 15ème jour pour diminuer rapidement ensuite, la même quantité de Brucella B19 S c'est-à-dire 10^6 germes qui a été utilisée dans nos expériences, infectée par voie sous-cutanée, ne permet pas d'observer une multiplication dans la rate puisque la bactérie n'est plus retrouvée après le 4ème jour. Mackaness n'a pas trouvé de relation directe entre l'état de résistance croisée à Listeria monocytogenes et l'hypersensibilité retardée; la persistance de l'antigène pourrait induire une certaine désensibilisation.

Cependant, ces résultats ne sont pas en contradiction avec les conclusions récentes du groupe de Mackaness (67) (68) (88) qui a montré l'importance d'une population de lymphocytes, à courte vie, non recirculante, dans l'établissement de l'immunité contre les bactéries intracellulaires; cette population serait capable, sous l'effet de l'injection virulente, de libérer des facteurs, peut être analogues au " Facteur Inhibiteur de la migration des macrophages" macrophages qui sont capables d'exprimer non spécifiquement leur état d'activation comme l'ont montré Elberg et Coll. (28). Ainsi les modifications induites par Brucella abortus B19 S injectée par voie sous-cutanée, pourraient porter davantage sur les lymphocytes que sur les macrophages. Ceci reste à vérifier.

CONCLUSION

De l'ensemble de ces observations il résulte que parmi les trois espèces utilisées la souris blanche s'est avérée la plus sensible dans un laps de temps assez court après l'injection d'épreuve. Cependant la réponse variant selon les individus, le traitement individuel des rates paraît indispensable, de préférence au broyage par groupe de 3 ou 5 souvent préconisé, si l'on veut éviter de multiplier ces groupes, donc le nombre d'animaux en expérience. Le broyage mécanique réalise une bonne libération des brucella intracellulaires et peut remplacer avantageusement le broyage manuel. Les Brucella résistant à la conservation au froid, il est possible de stocker les rates pendant les quelques jours qui suivent le sacrifice des animaux. L'utilisation d'une lignée sensible de façon homogène à Brucella abortus, comme la DBA2 ou la CBA, pourrait sans doute améliorer largement l'efficacité des contrôles ou de la mise au point des vaccins brucelliques.

Si le cobaye semble abriter Brucella abortus 544 plus longtemps que la souris CDI, l'hétérogénéité des réponses nous a fait préférer la souris dans les expériences d'immunisation. Cependant des recherches analogues à celles poursuivies chez la souris pourraient être entreprises.

Il est souhaitable que la comparaison des vaccins soit pendant une période d'essai, effectuée à la fois chez la souris et chez le cobaye; ceci permettrait peut être d'expliquer des divergences apparues lorsqu'on passe de la souris au bovin (34) et qui obligent à repenser le problème de l'extrapolation de l'animal de laboratoire à l'espèce naturellement sensible. Un tel travail est actuellement en cours dans le laboratoire du Professeur Pilet en vue de définir le mode de contrôle des vaccins contre Brucella abortus au niveau de la Pharmacopée Vétérinaire Européenne.

Il semble que la mise au point de nouveaux vaccins en matière de Brucellose puisse bénéficier d'une étude cinétique de l'établissement de la résistance et de l'étude de sa durée. L'utilisation de plusieurs doses

d'épreuve, qui présente bien sûr l'inconvénient d'augmenter le volume des expérimentations et qui a déjà été soulignée par de nombreux auteurs, ne peut que contribuer à l'amélioration des connaissances dans le domaine de l'immunité vis à vis des Brucella.

Si de nombreux travaux montrent l'importance, à côté des macrophages, des lymphocytes spécialement engagés dans l'immunité vis à vis des bactéries intracellulaires, le mécanisme de l'immunité dans la brucellose n'est pas élucidé, d'une part en ce qui concerne les différences entre vaccination par vaccin vivant et par vaccin tué, d'autre part en ce qui concerne l'immunité vraie induite par des souches en phase lisse ou par des souches en phase rugueuse.

Il est possible que le transfert à des animaux syngéniques irradiés, de certains types de cellules compétentes provenant d'animaux préalablement immunisés par des germes vivants ou inactivés puisse faire apparaître les différences dans le mode d'action et le degré d'immunité. L'association aux cellules compétentes de sérums d'animaux ayant reçu des bactéries en phase lisse ou rugueuse pourrait permettre demettre en évidence le rôle de certains anticorps à côté des cellules.

CHAPITRE II

VARIATION LISSE ⟶ RUGUEUSE CHEZ BRUCELLA ABORTUS ET IMMUNITÉ NON SPÉCIFIQUE.

L'activité adjuvante des Brucella sur la production d'anticorps dirigés contre les toxines tétaniques et staphylococciques et contre les Salmonella a été démontrée il y a plusieurs années par Ramon et Richou (102) (103).

Berger (7) a extrait de Brucella abortus en phase rugueuse une substance protéique préparée à partir de la phase phénolique de l'extraction du lipopolyoside selon Westphal. Cette substance nommée protodyne s'est révélée active contre les infections à Salmonella typhimurium, S. typhose, Diplococcus pneumoniae et Streptococcus mastitidis lorsqu'elle était infectée par voie intrapéritonéale.

Au laboratoire, Pilet et Coll. (97) ont mis en évidence l'action de Brucella abortus B19 S inactivée par les ultrasons sur l'infection à Klebsiella pneumoniae.

En 1970 Pilet et Sabolovic (101) ont montré que Brucella abortus inactivée par la chaleur peut protéger la souris Swiss contre une greffe de tumeur d'Ehrlich. Dans un travail réalisé en collaboration (Toujas) (132) nous avons montré que Brucella abortus B19 S inactivée était capable d'induire dans un premier temps une prolifération de la rate et du foie et, dans une période tardive, de stimuler la réponse contre les globules rouges de mouton et de favoriser la survie de souris recevant à différents temps après la stimulation une greffe de la leucémie L 1210,

initialement, chimiquement induite sur DBA, mais transplantable. Des résultats satisfaisants ont également été obtenus dans l'immunoprévention de la leucémie AKR tandis que dans un essai d'immunoprévention de l'induction de fibrosarcomes par le méthylcholanthène les résultats ont varié suivant les lignées pures utilisées qui ont répondu différemment à l'induction par le méthylcholanthrène (61). Enfin, Pilet et Coll. (99) (100) ont obtenu une réduction importante de la multiplication du virus de Newcastle dans l'oeuf, et de la mortalité chez les souris inoculées par le virus de la fièvre aphteuse ou par le virus Influenza après injection d'un lysat de B19 S par les ultrasons (81).

N'ayant pas à notre disposition un lipopolyoside, représentant l'antigène de surface, analogue à ceux qui sont obtenus à partir des entérobactéries, nous avons choisi d'utiliser le mutant rugueux de B19 S afin de savoir si la présence de cet antigène était nécessaire à l'activité immunostimulante. Nous avons comparé Brucella abortus en phase lisse ou en phase rugueuse dans trois systèmes :

I - La modification, après des temps variables d'immunostimulation, du système Reticulo Endothélial (SRE) et de la réponse spécifique, vis à vis des globules rouges de mouton chez la souris.

2 - L'influence sur l'infection par voie intrapéritonéale par Klebsiella pneumoniae de la souris.

3 - L'influence sur l'induction d'une leucémie murine virale, la leucémie de Charlotte Friend.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Préparations bactériennes : les souches suivantes des Brucella abortus ont été cultivées sur Albimi agar et inactivées par la chaleur à 65°C pendant une heure.

B19 S, B19 R mutant rugueux précédemment décrit, 45/0, 45/20 mutant rugueux obtenu par Mac Ewen (70) dérivé de la souche 45/0

A partir des souches B19 S et B19 R des ultrasonnats totaux ont été obtenus par action des ultrasons pendant 20' (BUS, T5) ou pendant 4 fois 20' (BUS MS1) dans un appareil MSE, les bactéries étant suspendues à raison de 5000 ug/ml (en poids sec) en tampon phosphate à 7,2. Des filtrats des BUS ont également été préparés par passage des ultrasonnats totaux après centrifugation à 47.000 g durant 20' sur membrane millipore 0,45 u.

Le vaccin PB + (93) (11) dans lequel les sites agglutinogènes de B19 S inactivée sont saturés par des anticorps spécifiques a été utilisé comme autre préparation non agglutinogène. Dans tous les cas une seule injection immunostimulante a été réalisée.

- Les souris étaient des hybrides F1 (C57 B16 X DBA 2) dans l'étude de la réponse à un antigène et de la résistance à l'infection par Klebsiella pneumoniae et des Balb C dans l'étude de la résistance à la leucémie de Charlotte Friend. Ces animaux provenaient du centre de sélection des animaux de laboratoire ++.

- L'hypertrophie de la rate a été appréciée par le poids de l'organe; elle est souvent considérée comme un reflet de l'activité adjuvante sur le SRE; cependant les endotoxines pouvant induire une rétention d'eau, nous avons également compté le nombre de cellules nucléées après broyage.

+ Institut Mérieux
++ C.N.R.S., Orléans la Source.

Etude de la réponse à un antigène; elle a été réalisée quatre jours après.

L'immunisation par les globules rouges de mouton est faite par voie intraveineuse à la dose de $2,5\ 10^8$ (G.R.M.).

La technique des " cellules Formant Plages d'hémolyse " (CFP) (PFC des anglo-saxons) c'est-à-dire la mise en évidence des cellules productrices d'anticorps 19 S anti GRM fixant le complément donc susceptibles de réaliser un plage d'hémolyse en présence d'hématies de mouton a été réalisée selon Jerne et Nordin (50) avec quelques modifications personnelles : en bref, les rates des animaux ayant reçu les GRM 96 heures auparavant sont prélevées et broyées au Potter dans 5 ml de tampon phosphate (PBS) 0,15 M à 7,2. La suspension obtenue est privée d'agglurinines par passage sur un filtre en nylon (Pharmacia)$^{++}$.

Une partie aliquote est diluée au 1/25ème dans le milieu 199 privé au préalable des ions Ca++ et Mg^{++} par addition de sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique (Titriplex) en quantité stoechiométrique : 0,2 ml de la suspension et sont ajoutés à une préparation d'agarose à 1% en milieu 199 (sans Ca^{++} et Mg^{++}) contenant 0,5% d'albumine bovine et maintenue en surfusion. Cette préparation est versée sur une couche préparée à l'avance d'agarose à 1,4% en milieu 199 privé d'ions bivalent. On incube 1 H. le complément dilué au 1/10 en tampon de Mayer est ajouté et l'on incube à nouveau 1/2 heure à 37°C. A ce moment, on compte les plages d'hémolyse parallèlement, la numération des cellules est effectuée en chambre de Malassez.

- " Cellules Formant Rosettes " (CFR) (RFC des anglo-saxons) : Elles ont également été réalisées à partir des cellules de la rate, selon la technique de Biozzi (8).

La suspension de rate obtenue comme précédemment est diluée au 1/10 en PBS et centrifugée à 200 g pendant 5 minutes pour éliminer les anticorps libres, avec remise en suspension sur plateau tournant (+).

\+ Apelab
++ Jarre Jacquin.

On mélange alors 24 X 10^6 GRM à 6.10^6 cellules sous le volume de 1 ml. On centrifuge à nouveau 5 minutes à 200 g. Toutes ces opérations sont réalisées à 4°C. La remise en suspension se fait sur plateau tournant pendant 10'; la numération des rosettes est faite en cellule de Malassez.

Les variations du SRE et de la réponse aux GRM sont exprimées sur les courbes en index d'immunostimulation, qui est le rapport,

$$\frac{\text{résultats chez les traités}}{\text{résultats chez les témoins}}$$

- Etude de la résistance aux Klebsiella

La virulence de la souche Klebsiella pneumoniae d'origine animale a été entretenue par passage sur la souris. L'infection est réalisée par voie intrapéritonéale à partir d'une suspension en mucine à 2,5 %. La DL 50 est préalablement déterminée par la méthode de Reed et Muench après observation de la mortalité pendant 5 jours.

L'immunostimulation a été réalisée par voie intraveineuse lorsqu'elle précédait de 24 à 72 H. l'inoculation virulente; la voie sous-cutanée a été retenue pour les essais d'immunostimulation à long terme c'est-à-dire du J -3 au J -50 avant l'inoculation virulente.

- Etude de la résistance à la leucémie de Charlotte Friend :

Des souris Balb C âgées de 4 semaines ont reçu une dose de virus mortelle en 22 jours au maximum, de la Leucémie de Charlotte Friend, par voie intrapéritonéale.

L'immunostimulation a été réalisée par l'injection d'une dose unique de 500 ug de B19 S ou B19 R inactivées par la chaleur soit par voie intraveineuse aux jours -10, -20, -30, -40 par rapport à l'inoculation du virus, soit par voie intrapéritonéale aux jours -2, -3, -5, -7, -10 mais aussi au jour + 1, ou + 3 c'est-à-dire que nous avons tenté une immunothérapie.

RÉSULTATS

Modification du SRE et de la réponse aux globules rouges de mouton.

La courbe 7 et le tableau 10 montrent que la rate subit une hypertrophie notable après l'injection intraveineuse de B19 S et B19 R, cependant, au 10ème jour, le maximum atteint avec B19 S est très supérieur à celui obtenu avecB19 R de plus, alors que l'hypertrophie reste très marquée au jour 40 et même au jour 60 après l'injection de B19 S, à ce stade, la différence avec les témoins n'est plus significative en ce qui concerne B19 R. La courbe de modification de la cellularité (figure 8, Tableau 11) suit à très peu près celle de l'hypertrophie bien qu'en ce qui concerne B19 R l'augmentation des cellules nucléées soit plus importante que l'hypertrophie.

Les courbes 9 et 10 représentent l'expression de la modification de la réponse aux GRM, d'une part en cellules formant plaques (CFP) par rate, d'autre part en cellules formant rosettes (CFR).

La réponse en CFP après injection de B19 S n'est pas modifiée pendant les premiers jours mais subit une dépression au jour 10 pour remonter ensuite progressivement jusqu'au 40ème jour après l'injection, à ce moment le nombre de CFP est multiplié par 2. Par contre après B19 R on note un accroissement immédiat et important (index à 2,5) du nombre des CFP, cette augmentation est transitoire puisqu'au 5ème jour le niveau des témoins est atteint et que par la suite on note un accroissement progressif beaucoup moins important qu'avec B19 S.

La réponse en CFR diffère sensiblement de celle des CFP. Après l'injection de B19 S le nombre de CFR diminue jusqu'au 5ème jour, puis croît pour atteindre un maximum (index de 2,5) au jour 10; la stimulation reste importante 60 jours après l'injection de B19 S.

Après injection de B19 R ou de la préparation PB, on note, comme lors de la réponse en CFP, un accroissement immédiat et important (index à 3) puis une diminution qui ramène l'index à 1 au 20ème jour. Par la suite on n'observe pas d'accroissement à long terme, contrairement aux CFP.

TABLEAU X

Hypertrophie de la rate (poids en mg) après immunostimulation par B19 S et B19 R inactivées

Temps en jours après l'inoculation	B19 S	B19 R
1	109 ± 20	220 ± 25
4	220 ± 32	300 ± 19
9	500 ± 25	210 ± 28
14	470 ± 22	158 ± 32
24	330 ± 18	125 ± 32
34	360 ± 30	110 ± 15
60	194 ± 19	93 ± 17
	Témoins = 83 ± 15	

Figure 7: Hypertrophie splénique appréciée par l'augmentation du poids à différents temps après l'immunostimulation par B19 S et B19 R inactivées administrées à la dose de 500 ug par voie intraveineuse.

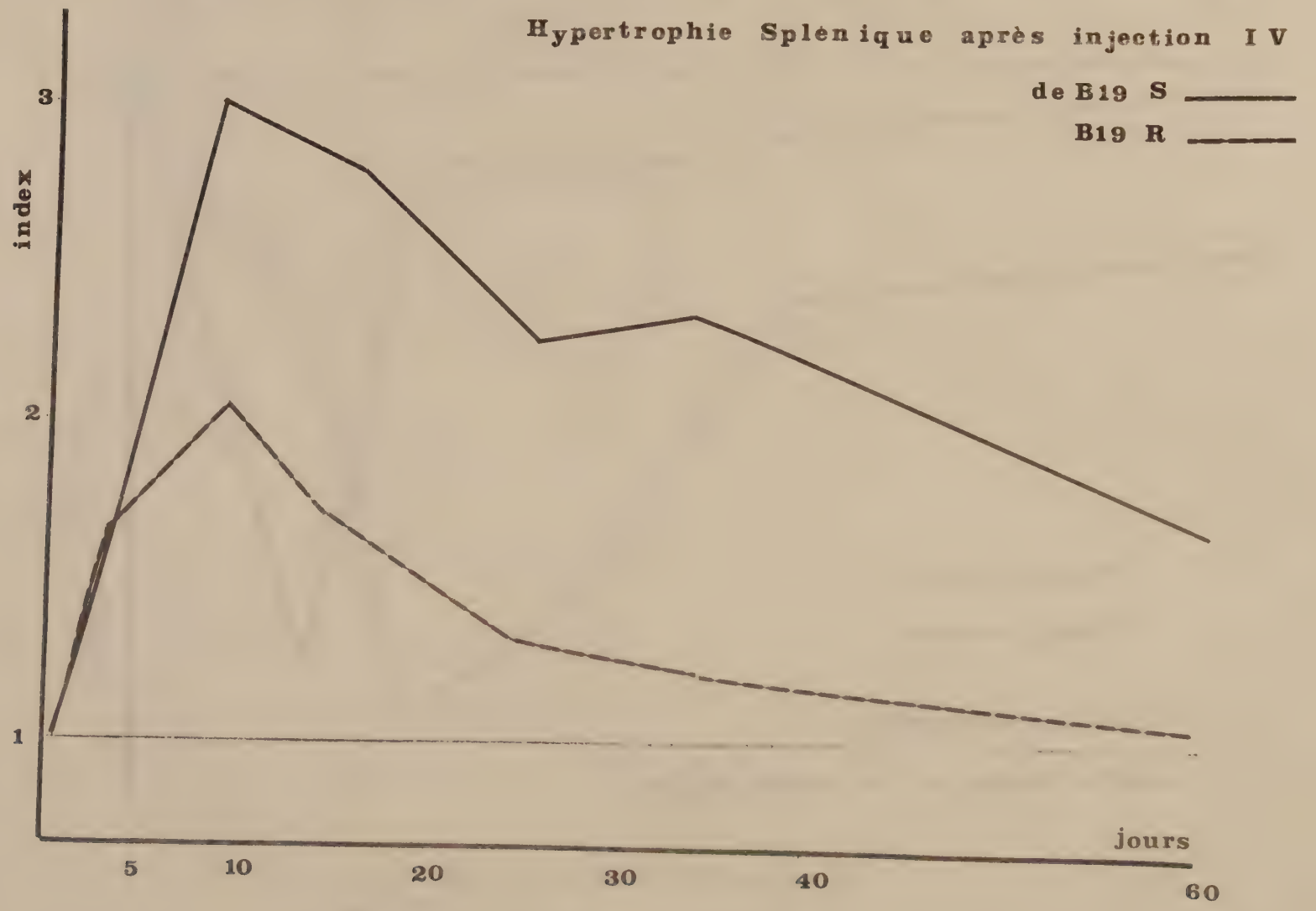


Figure 8: VARIATION DU NOMBRE DE CELLULE NUCLEEES DANS LA RATE A DIFFERENT TEMPS APRES L'INJECTION INTRAVEINEUSE DE B19 S ET B19 R INACTIVE (500 UG).

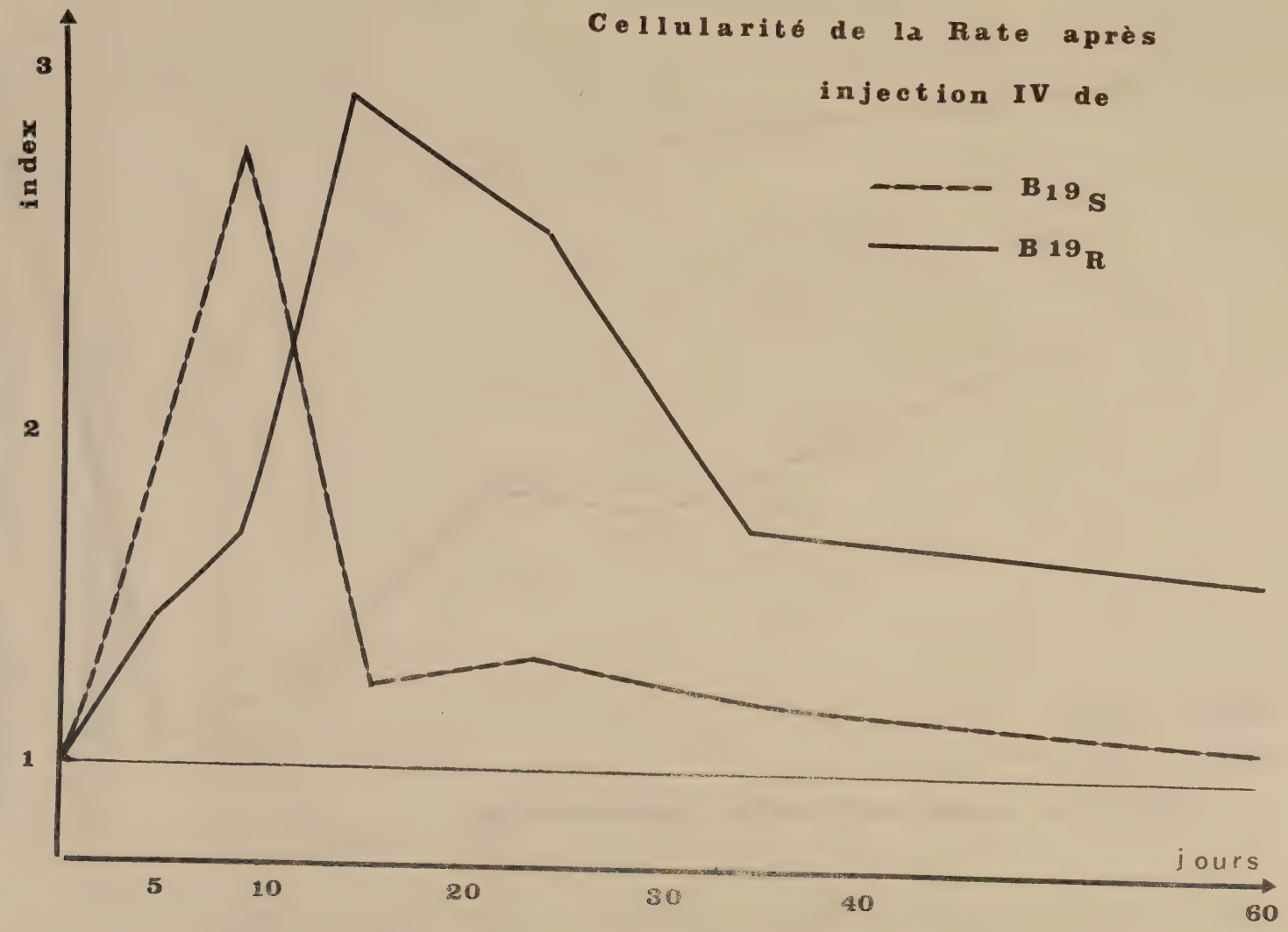


TABLEAU XI

Modification du nombre de cellules nucléées dans la rate après injection intraveineuse de 500 ug de B19 S ou B19 R inactivées

	B19 S		B19 R	
	Nombre de cellules nucléées	Index de stimulation	Nombre de cellules nucléées	Index de stimulation
J + 4	102,5 ± 40	1,48 S	139,6 ± 19	2 S
J + 9	126,1 ± 42,7	1,71 S	212,3 ± 13,5	2,88 S
J +14	205,8 ± 56	3,01 S	87,4 ± 50,3	1,27 non S
J +24	169 ± 66,2	2,64 S	85 ± 23,3	1,32 non S
J +34	160,5 ± 41	1,77 S	109,4 ± 25,2	1,20 non S
J +60	125,6 ± 30	1,53 S	-	-
Témoins 83 ± 17				

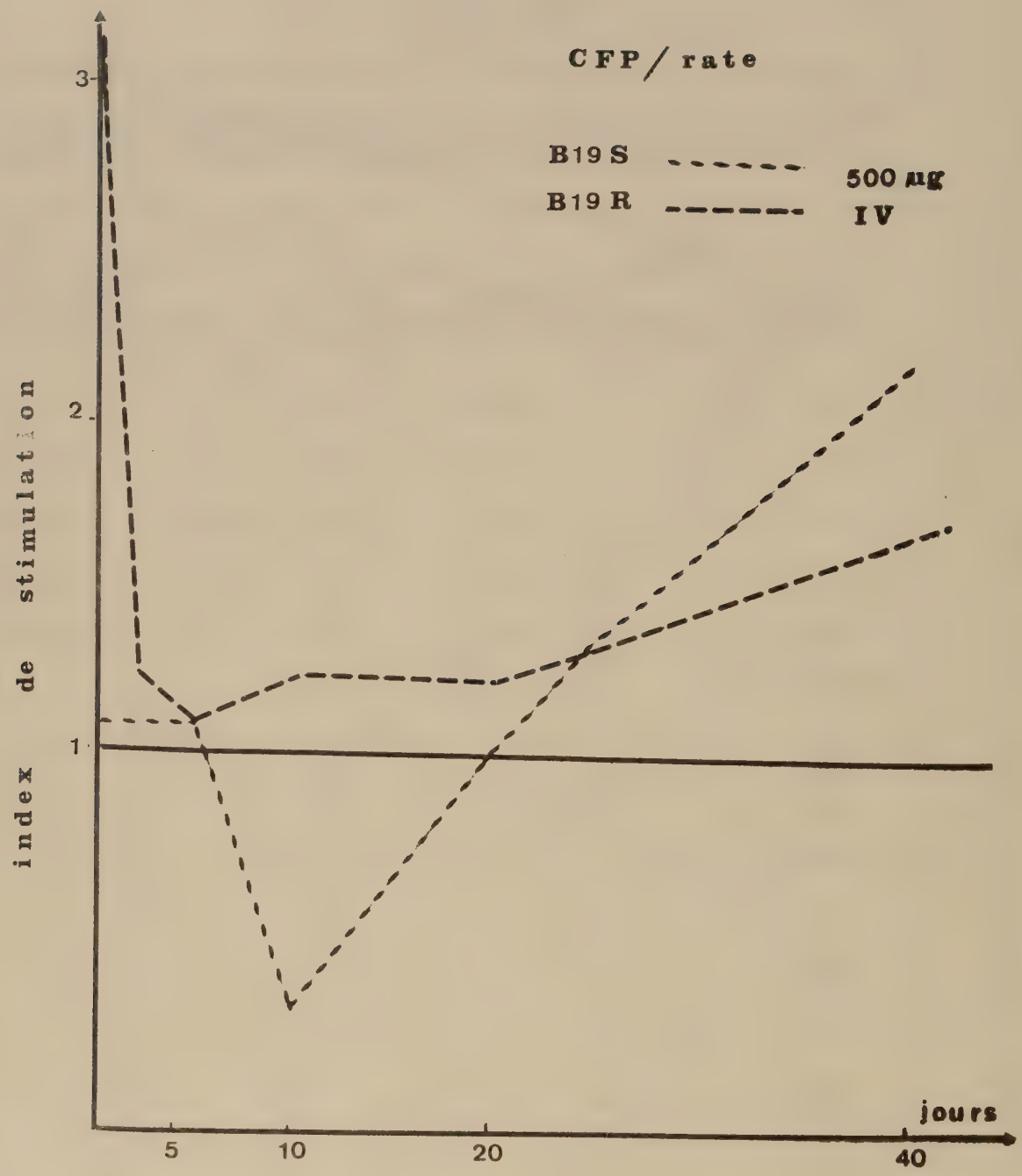


Figure 9: CELLULES FORMANT PLAGES d'HEMOLYSE après INJECTION INTRAVEINEUSE de B19S ou B19R inactivées (500ug)

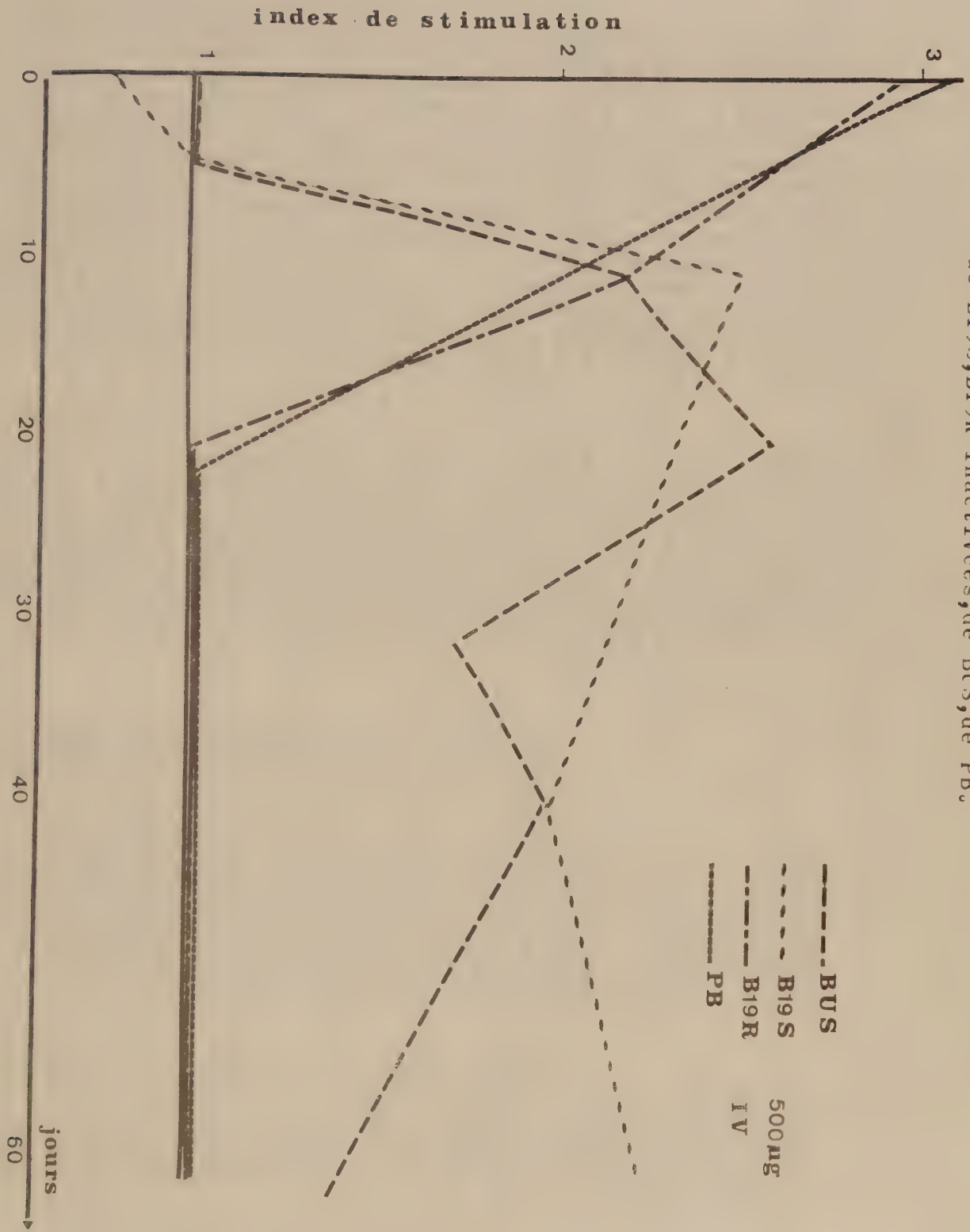


Figure 10: ROSETTES PAR RATE après INJECTION INTRAVEINEUSE de 500ug de B19S,B19R inactivées,de BUS,de PB.

Afin de rechercher le seuil d'activité de Brucella abortus en phase rugueuse injectée le même jour que l'antigène, nous avons fait varier les doses de 31, 25 ug à 1.000 ug comparativement à des doses analogues de B19 S. Ici c'est le test des CFP qui a été utilisé. Les résultats consignés dans le tableau 12 montrent que l'immunostimulation immédiate induite par les souches en phase rugueuse peut être obtenue avec de très faibles doses, par contre, à aucun moment le phénomène n'a pu être en évidence avec B19 S. La cinétique de la réponse en CFP, après injection de 50, 500, 1000 ug de B19 R montre qu'en dehors d'une stimulation entre les jours 2 et 5 avec B19 R à 1000 ug la stimulation tardive au 40ème n'est pas obtenue avec B19 R quelque soit la dose,contrairement à ce qui est observé avec B19 S à 500 ug (fig. 11).

Les faits mis en évidence pouvaient être l'apanache de la seule souche vaccinale B19 S et de son mutant Rough, nous avons comparé simultanément l'action de Brucella abortus 45/0 et de son mutant rough, la souche vaccinale 45/20, injectés le même jour que les GRM, sur la réponse en CFR. Les résultats exprimés dans le tableau 13 montrent que l'accroissement de la réponse aux GRM, dans ces conditions, est une propriété des souches en phase rugueuse et non pas de la seule souche B19 R.

- Modification de la résistance vis-à-vis de l'infection à Klebsiella pneumoniae

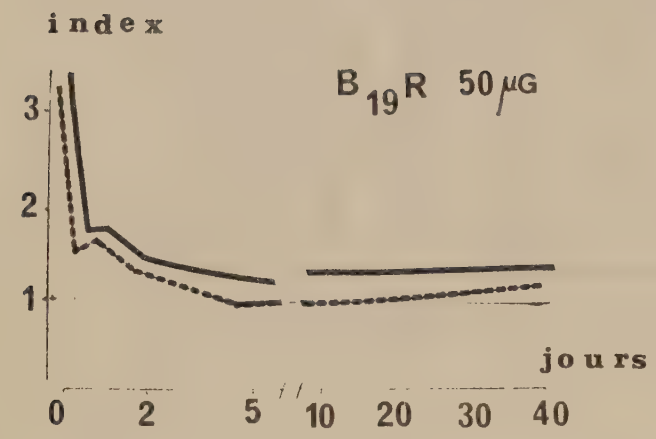
La mise en évidence de l'effet protecteur obtenu par injection intrapéritonéale de Brucella abortus B19 S inactivée par les ultrasons posait le problème de la nature de l'antigène protecteur, c'est pourquoi nous avons comparé dans les mêmes conditions, l'activité d'une part, de B19 S et B19 R inactivées par la chaleur, d'autre part, des ultrasonnats de ces deux souches.

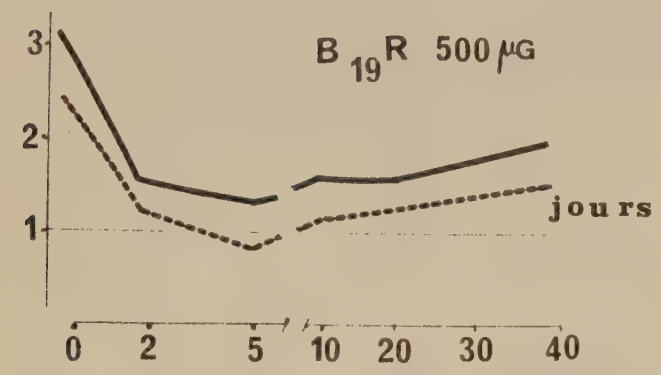
La figure montre que, dans les conditions de l'expérimentation (26 DL 50) aucune différence n'a pu être établie entre B19 S et B19 R. Par contre, à la même dose, les ultrasonnats se sont avérés un peu moins efficaces puisque 500 ug de l'un ou l'autre n'ont pas permis d'atteindre une survie de cent pour cent.

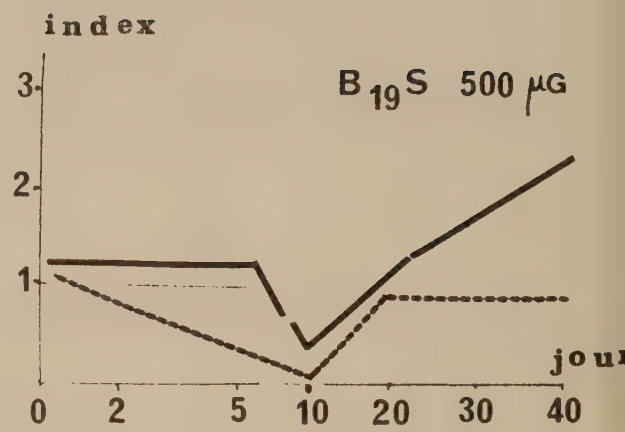
TABLEAU XII

Influence de la dose et de la phase des Brucella inactivées sur la réponse en cellules formant plaques (CFP), lorsque l'antigène (G.R.M.) et l'immunostimulant sont administrés le même jour.
I.S. = Index de stimulation

TEMOINS		Doses	IMMUNOSTIMULATION							
			B19 S				B19 R			
Nombre de CFP par rate	Nombre de CFP pour 10^6 cellules	en ug	Nombre de CFP par rate	IS	Nombre de CFP pour 10^6 cellules	IS	Nombre de CFP par rate	IS	Nombre de CFP pour 10^6 cellules	IS
84.250 ± 6000	498	31,25	122.075 ± 6375	1,45 non S	499	1	198.000 + 10450	2,35 S	969	1,95
48.950 ± 4825	480	62,5	81.037 ± 3825	1,65 non S	408	1,37	127.287 ± 8175	2,60 S	619	2,08
108.250 ± 5150	690	125	122.250 ± 11175	1,13 non S	606	0,88	293.950 ± 11650	2,71 S	939	1,36
31.037 ± 4125	173	250	43.750 ± 4975	1,41 non S	230	1,33	107.912 ± 14125	3,48 S	477	2,75
67.500 ± 9250	360	500	73.950 ± 8000	1,09 non S	289	0,80	157.500 ± 24500	2,33 S	824	2,28
33.875 ± 6625	229	1000	55.626 ± 6625	1,65 non S	210	1,92	139.500 + 10375	4,12 S	437	1,91







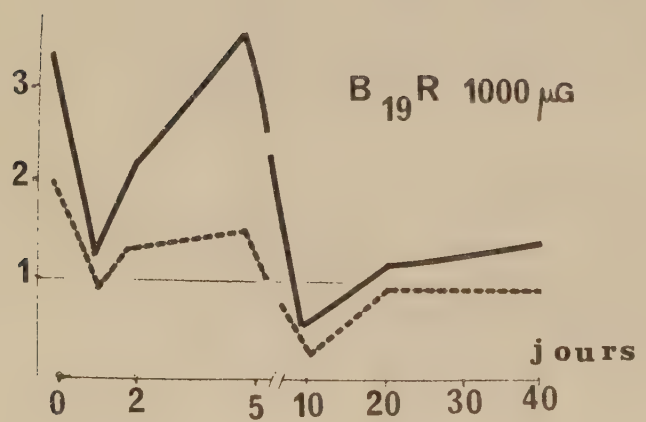


Figure II: COMPARAISON DE 3 DOSES DE B19 R (50,500,1000 ug) A B19 S (500 DANS LA MODIFICATION DU NOMBRE DES "CELLULES FORMANT PLAQUES"(CFP).

TABLEAU XIII

Comparaison de B19 S, B19 R, 45/0, 45/20 inactivés par la chaleur sur la modification du nombre de " Cellules formant Rosettes " (CFR) lorsque l'injection est réalisée le même jour que l'injection de globules rouges de moutons (GRM)

	Cellules nucléées/rate x 10^6		CFR/Rate		CFR/10^6 cellules	
B19 S	102,8 ± 11,5	non S	389 ± 61,3	S	6355 ± 499	non S
B19 R	93,8 ± 23,9	S	1475 ± 672	S	16716 ± 10365	S
TEMOINS	70,03 ± 14		509 ± 112		7289 ± 905	S
45/0	96,4 + 28,9	non S	964,4 ± 508	non S	10115 ± 4424	non S
45/20	90,9 ± 14,9	non S	1383,6 ± 360,6	S	12253 ± 3753	S
TEMOINS	78,5 ± 44,9		697,6 ± 460,3		8741 ± 2989	

Cependant, le BUS en phase rugueuse s'est montré plus efficace que le BUS en phase lisse. Cette supériorité du BUS R a été confirmée par l'injection de 100 DL 50.

Dans le but de savoir si, en dehors de l'antigène somatique, la structure de base de la paroi avait un rôle à jouer dans le type de stimulation observée, nous avons comparé les ultrasonnats totaux et filtrés.

Des résultats apparemment contradictoires ont été observés puisque les figures 13 et 14 montrent, dans le premier cas une diminution de l'activité, dans l'autre cas, aucune différence n'apparaît après filtration. Ces résultats seront discutés.

Dans une seconde étape, nous avons voulu rechercher s'il existait une possibilité de protection à long terme contre l'infection à Klebsiella pneumoniae. Il nous a semblé que dans ce but la voie sous-cutanée pouvait être envisagée pour l'injection des Brucella.

Les injections de bactéries inactivées ont précédé de 50, 40, 30, 20, 7 et 3 jours l'infection par Klebsiella pneumoniae. La figure 15 fait apparaître une supériorité de la souche en phase smooth sur la souche en phase rough. Cependant il faut noter qu'avec la souche B19 S la résistance diminue lorsque le temps qui sépare l'immunostimulation de l'infection augmente. En ce qui concerne la souche B19 R il est difficile de tirer une règle générale.

A noter que la protection obtenue par voie sous-cutanée au J -3 est inférieure à celle obtenue par voie intrapéritonéale.

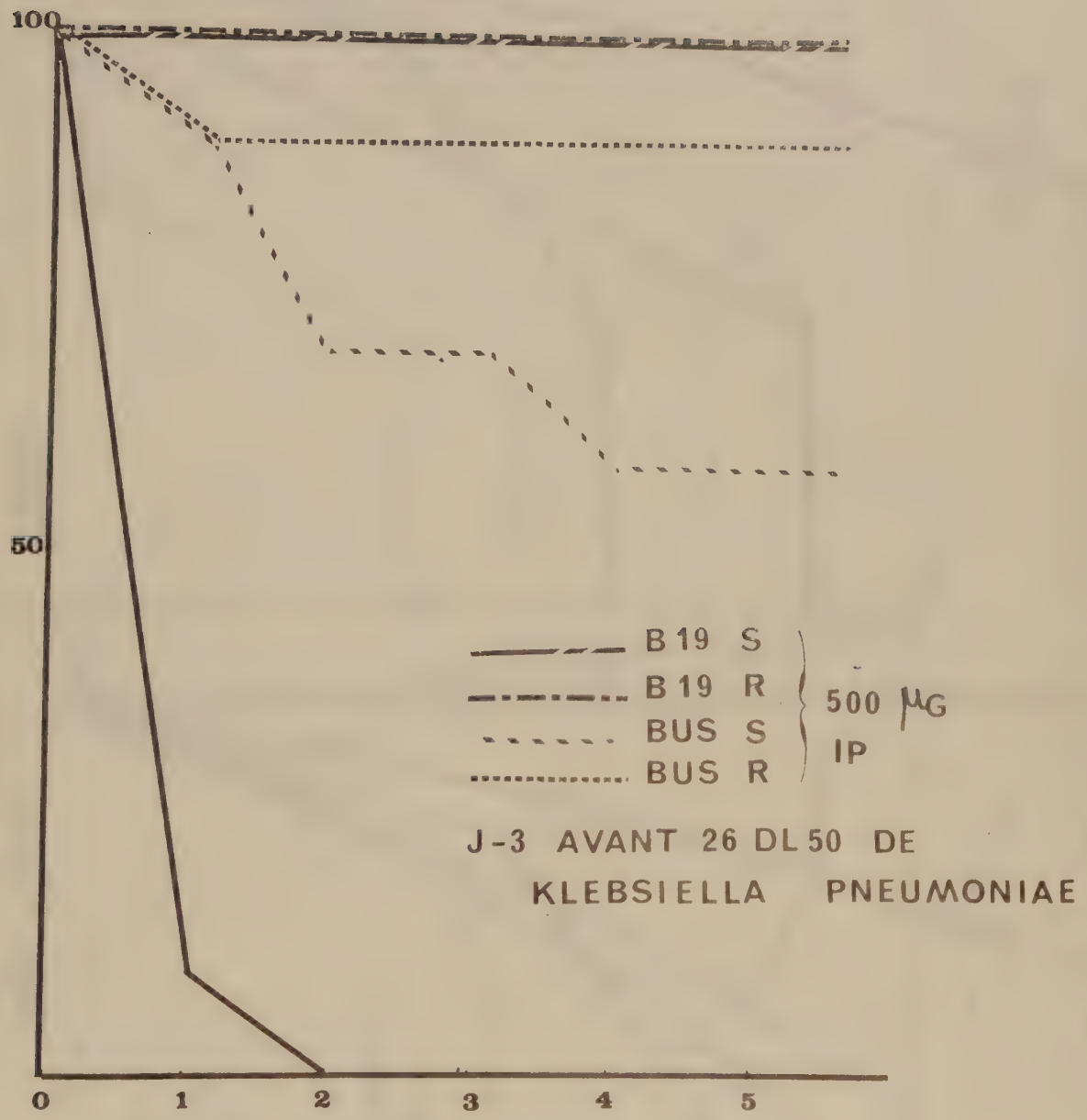


Figure I2. POURCENTAGE DE SURVIE APRES INJECTION INTRAPERITONEALE AU J-3 DE L'INFECTION PAR 26DL50 DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE,DE 500 ug,de BI9 S,BI9 R,BUS S,BUS R.

Figure I3: POURCENTAGE DE SURVIE APRES INJECTION INTRAPERITONEALE AU J-3 DE L'INJECTION PAR I5 DL 50 DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE, DE BUS (T5),BUS(T5) FILTRE.

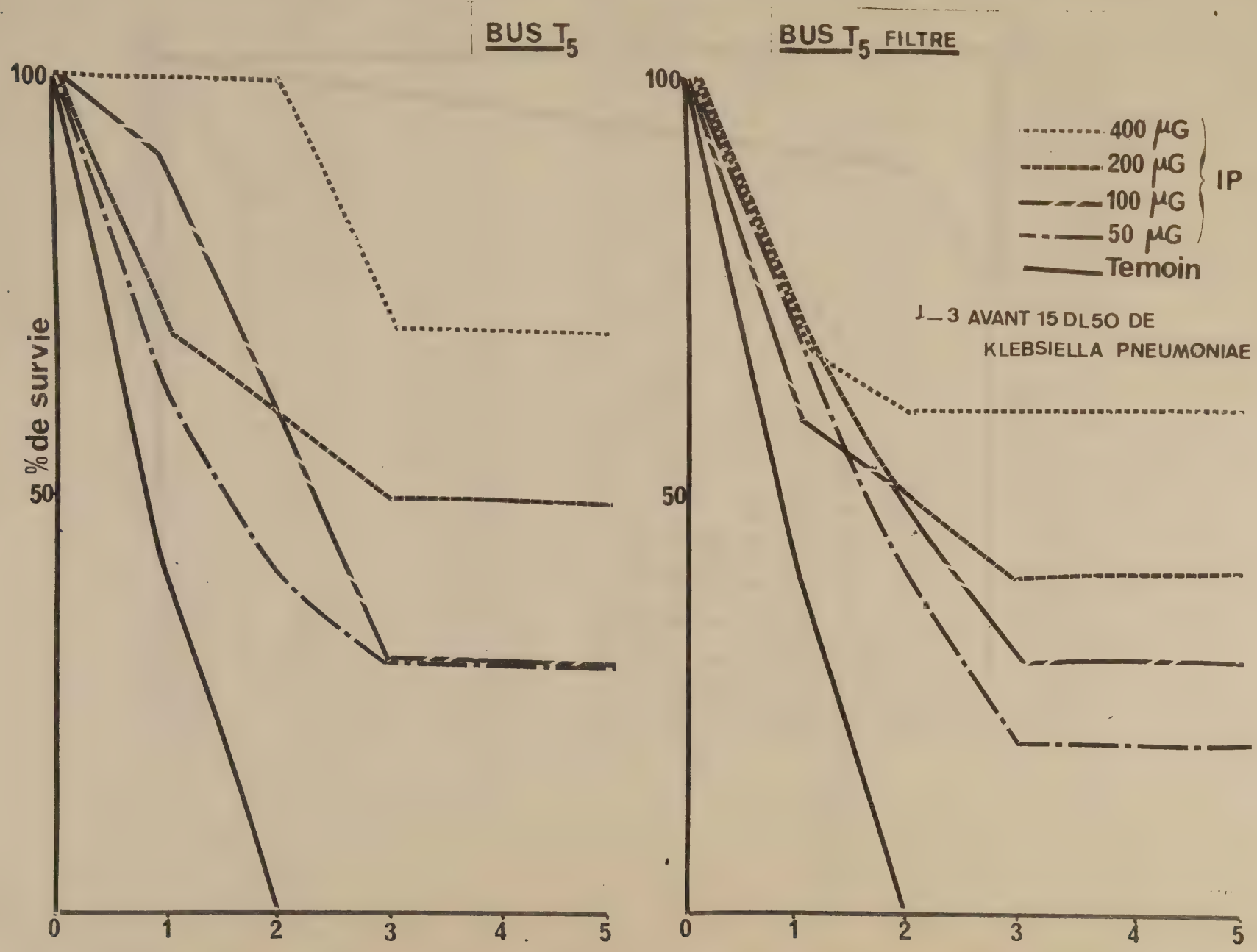


Figure I4: POURCENTAGE DE SURVIE APRES INJECTION INTRAPERITONEALE AU J-3 DE L'INJECTION PAR I50 DL 50 DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE, DE BUS (MSI),BUS (MSI) FILTRE.

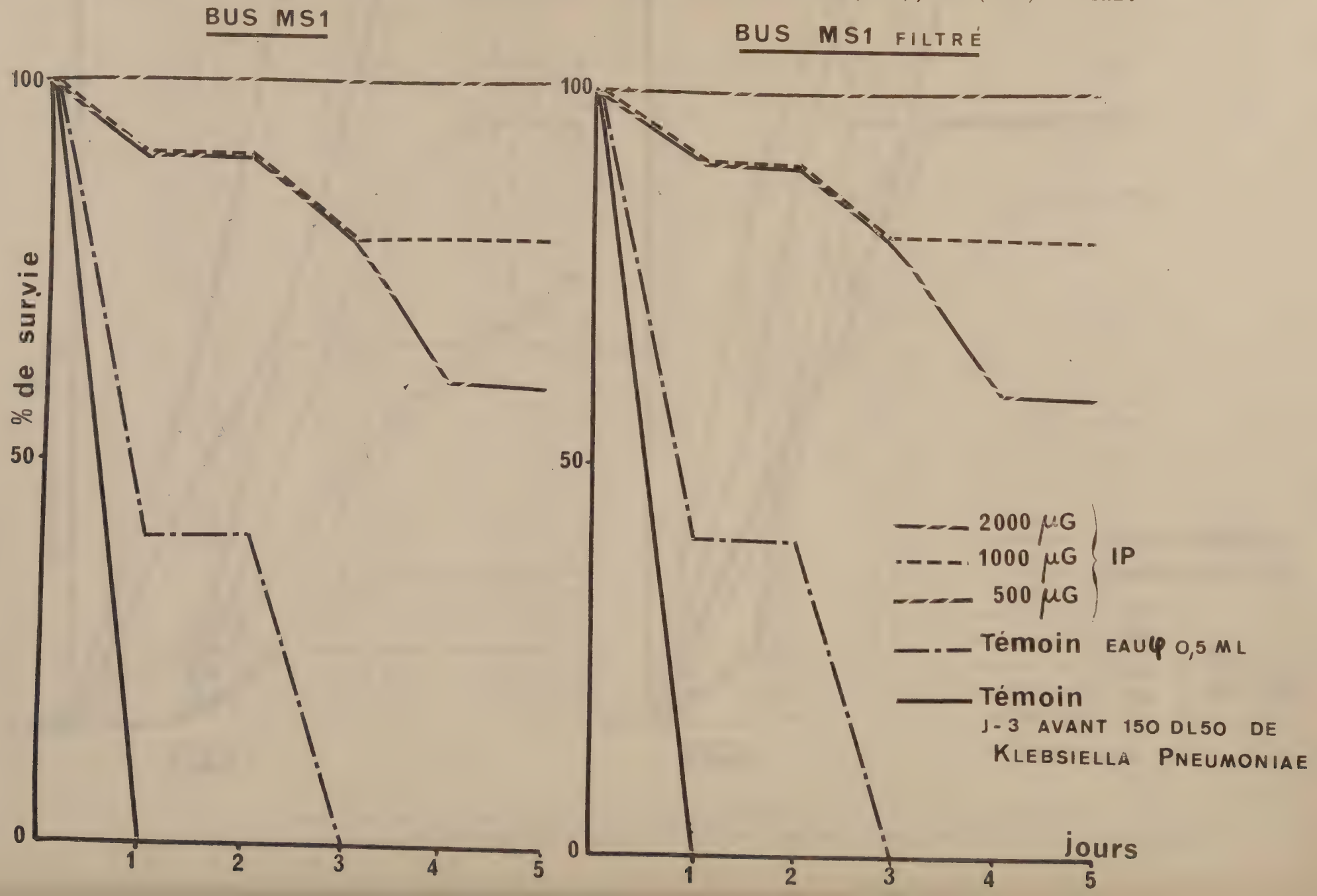
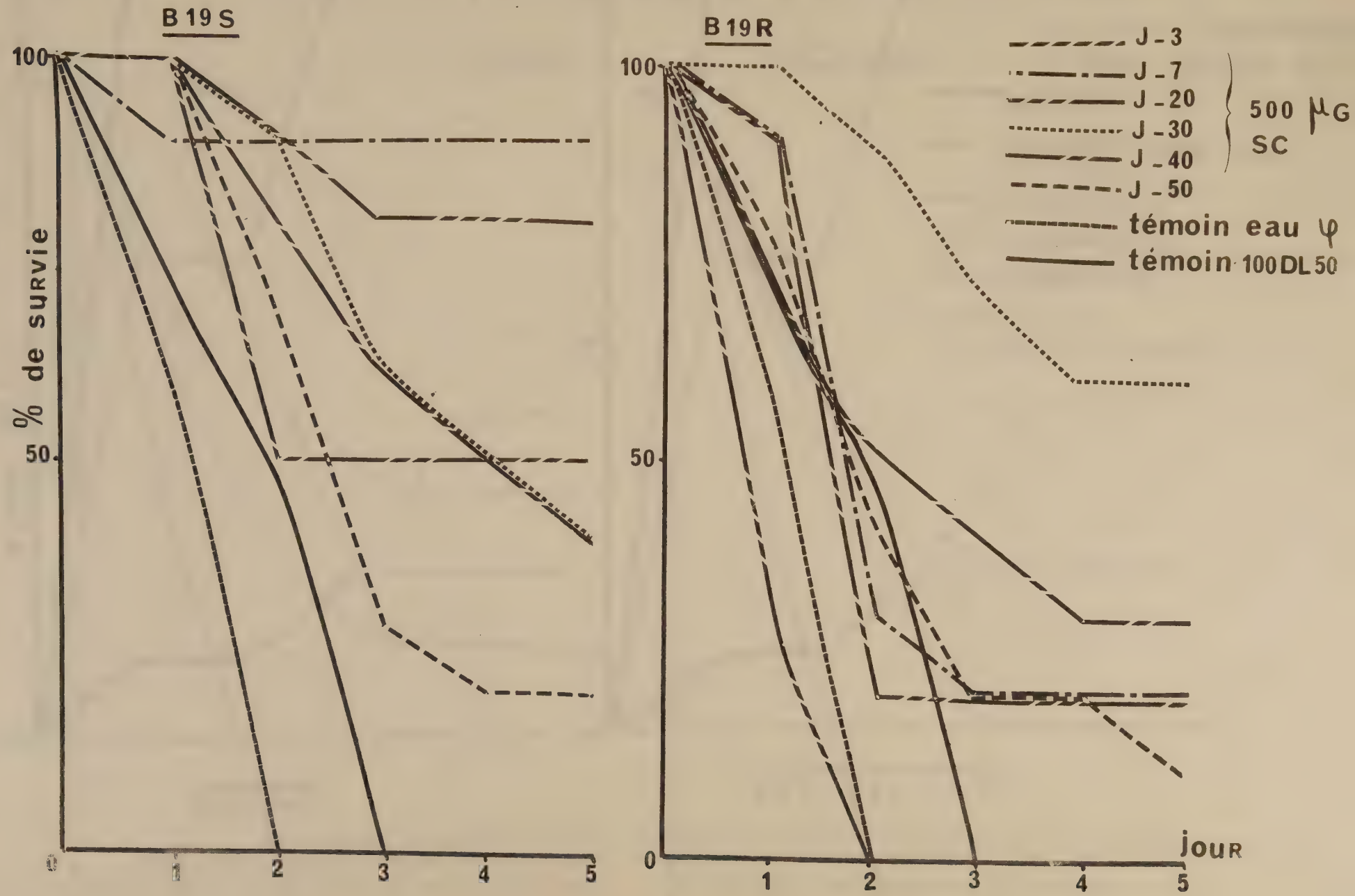


Figure I5: POURCENTAGE DE SURVIE APRES INJECTION SOUS-CUTANEE AU j-3 DE L'INJECTION PAR 100 DL 50 DE KLEBSIELLA PNEUMONIAR,DE 500 ug DE BI9 S,BI9 R.



Leucémie de Charlotte Friend

Les résultats de l'immunoprévention de la Leucémie de Charlotte Friend par voie intraveineuse ou intrapéritonéale et l'immunothérapie par voie intrapéritonéale sont présentés dans les figures 16, 17, 18, 19.

- Une première observation s'impose : l'administration de 500 ug de Brucella abortus inactivée par la chaleur n'a dans aucun cas permis la survie définitive des animaux traités; cependant la prolongation de survie est très notable dans l'ensemble.

- La voie intrapéritonéale qui est aussi la voie d'inoculation du virus a donné les meilleurs résultats. La survie maximale à 50 % est du même ordre de grandeur, environ 50 jours avec B19 S et B19 R par voie intrapéritonéale. La prolongation maximale à 50 % est légèrement supérieure avec B19 R, la différence est encore plus évidente si on considère la fin des observations.

Les meilleurs résultats sont observés lorsque l'immunostimulation a lieu aux jours - 5 ou - 7.

- Le fait plus notable est que l'immunothérapie par voie intrapéritonéale, aux jours + 1 et + 3 a donné des résultats très encourageants.

La voie intraveineuse s'est avérée moins efficace que la voie intrapéritonéale; les meilleurs résultats sont obtenus avec l'injection au jour - 10 pour B19 S,au jour - 20 pour B19 R, si l'on exclut une légère facilitation.

- Enfin, il faut noter que les souris répondent différemment à l'immunostimulation puisque l'on observe parfois une facilitation, celle-ci concerne également un faible pourcentage si ce n'est dans le cas particulier de B19 R injecté par voie intraveineuse (Fig.17), où l'injection au jour - 10 a donné une facilitation chez 50 % des animaux alors que l'autre moitié a présenté une prolongation de survie d'au moins 12 jours.

Figure I6: ESSAI D'IMMUNOPREVENTION CONTRE LA LEUCEMIE DE CHARLOTTE-FRIEND PAR INJECTION INTRAVEINEUSE DE BRUCELLA ABORTUS INACTIVEE.

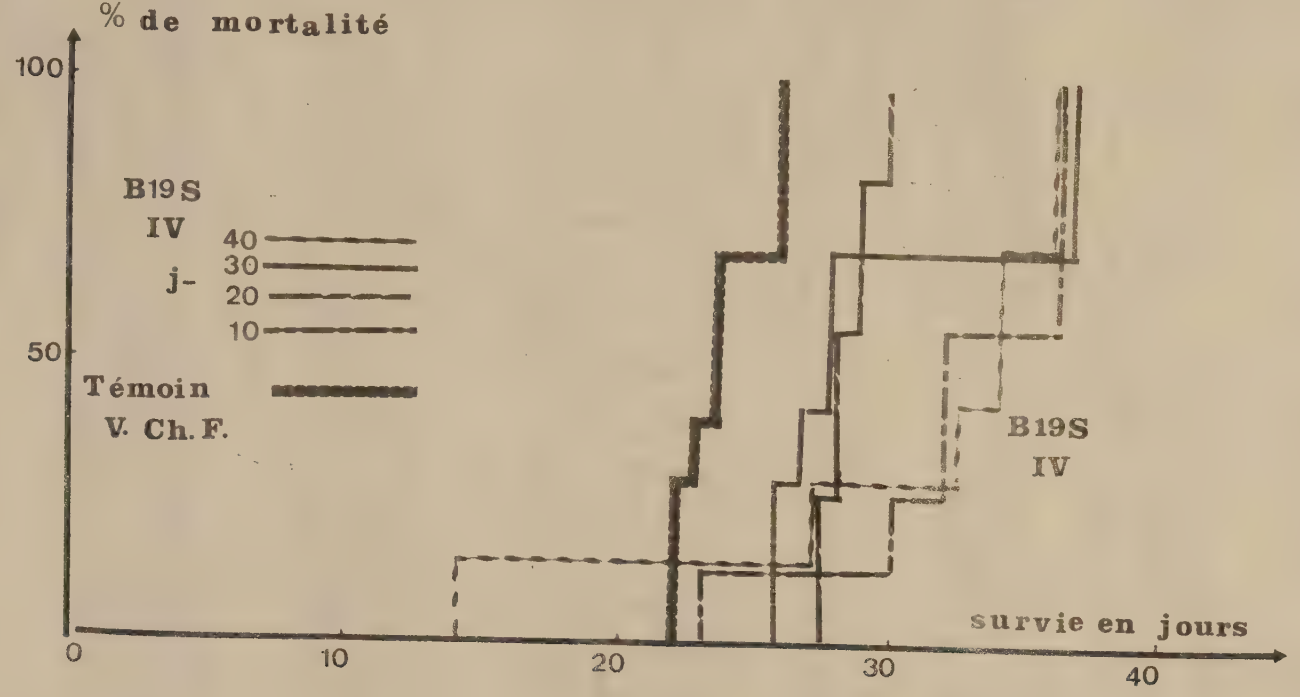


Figure I7: ESSAI D'IMMUNOPREVENTION CONTRE LA LEUCEMIE DE CHARLOTTE-FRIEND PAR INJECTION INTRAVEINEUSE DE BRUCELLA ABORTUS BI9 R INACTIVEE.

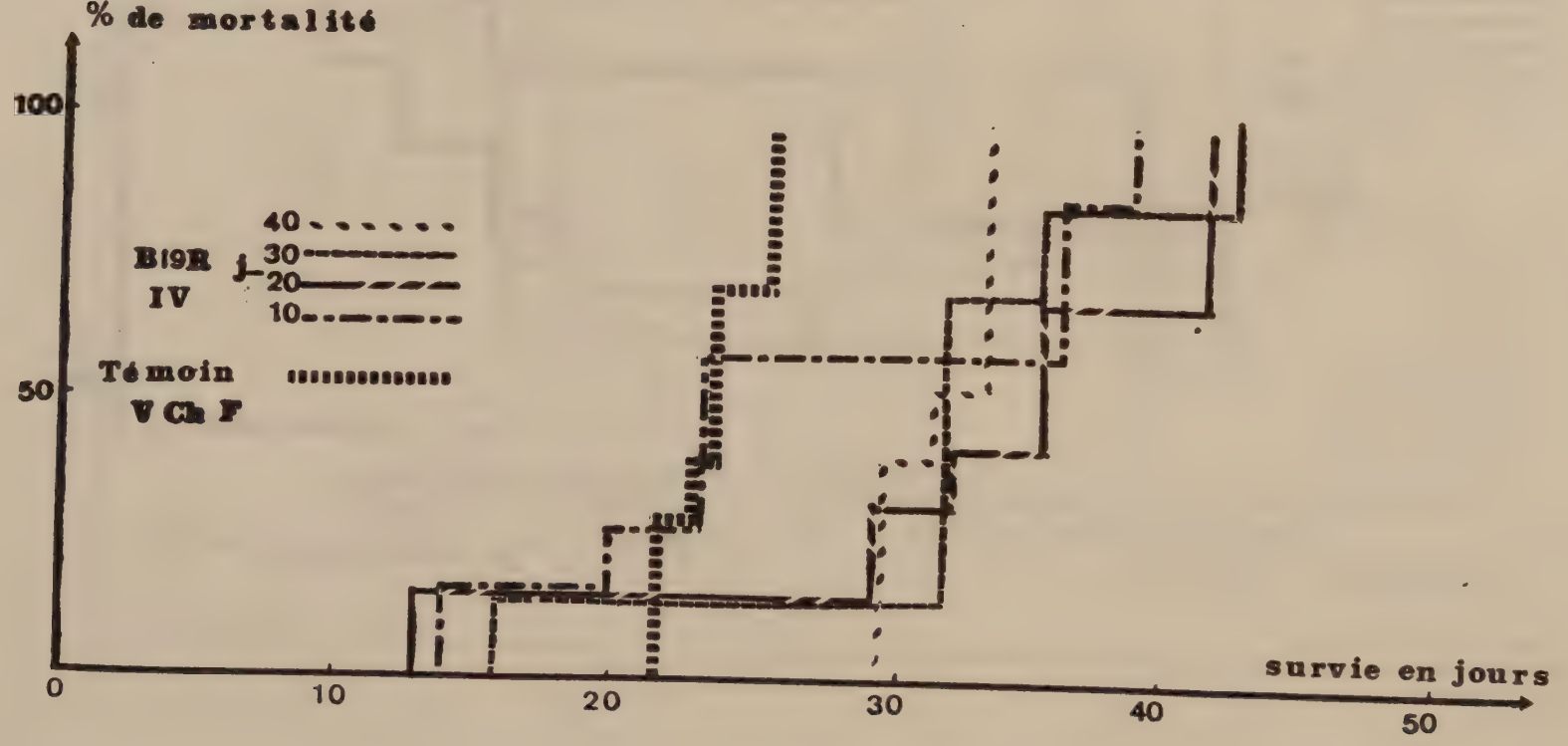


Figure I8: ESSAI D'IMMUNOPREVENTION OU D'IMMUNOTHERAPIE CONTRE LA LEUCEMIE DE CHARLOTTE - FRIEND PAR INJECTION INTRAPERITONEALE DE BRUCELLA ABORTUS B19 S INACTIVEE.

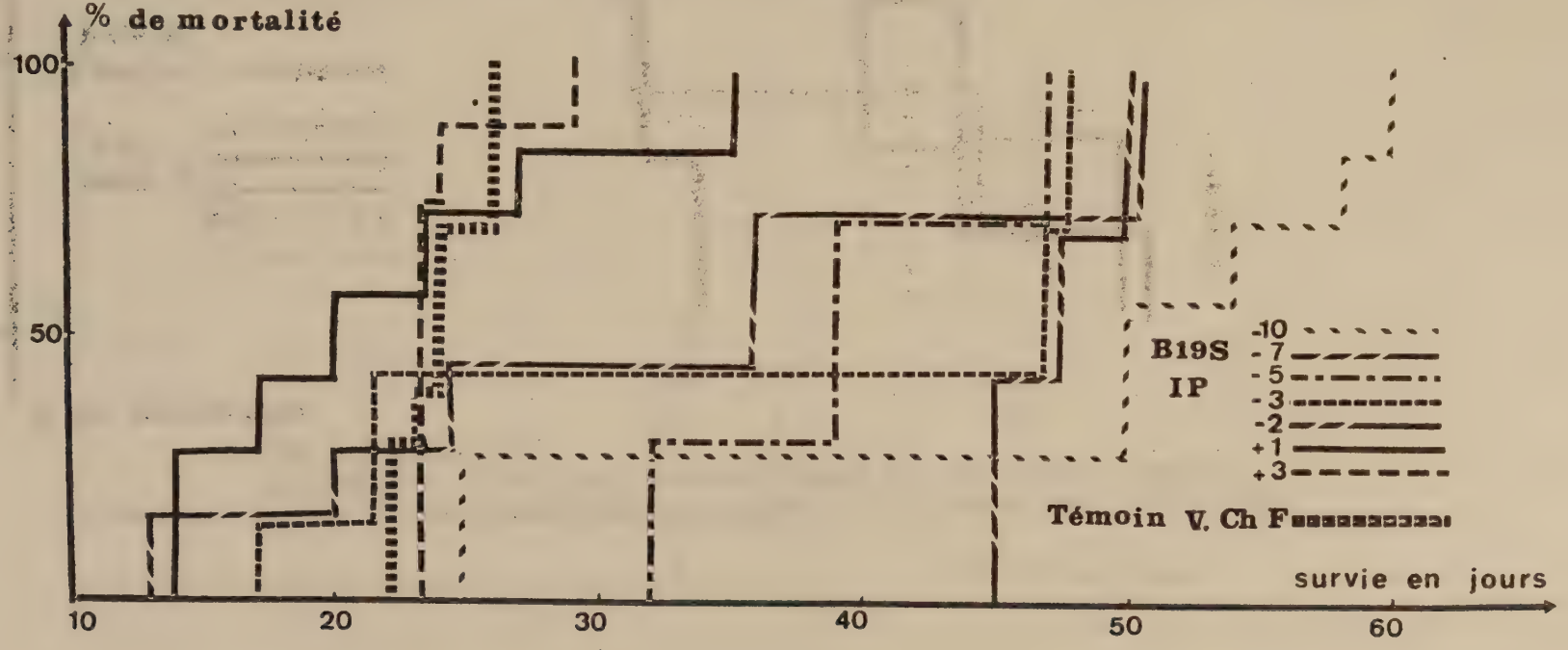
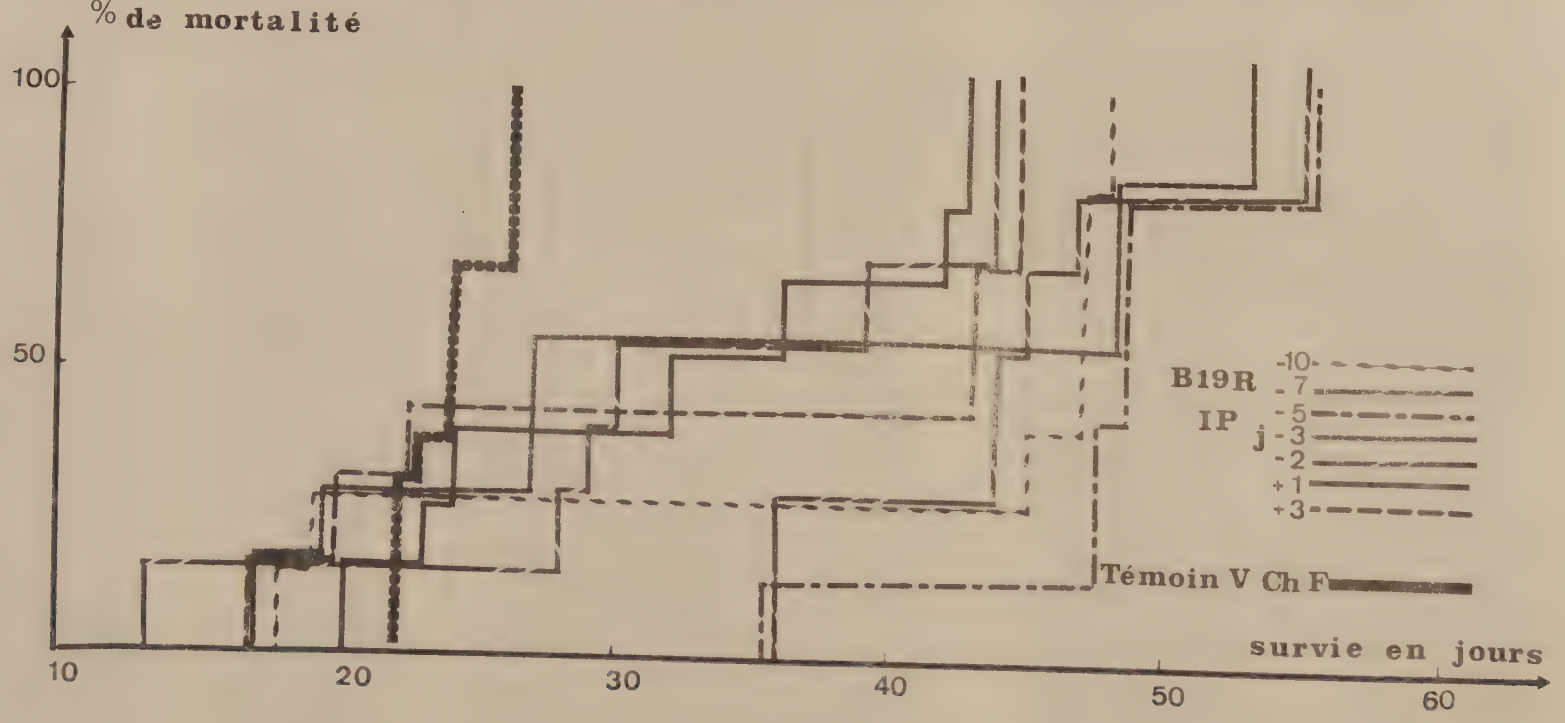


Figure I9: ESSAI D'IMMUNOPREVENTION OU D'IMMUNOTHERAPIE CONTRE LEUCEMIE DE CHARLOTTE-FRIEND PAR INJECTION INTRAPERITONEALE DE BRUCELLA ABORTUS B19 R INACTIVEE.



DISCUSSION

Une première constatation s'impose; alors qué l'injection intraveineuse de B19 S induit des modifications importantes et de longue durée au niveau de la rate, B19 R donne lieu à des changements de moindre amplitude et de courte durée puisqu'au 10ème jour le poids et la cellularité ne sont plus significativement différents de ceux des témoins. On peut donc penser que l'antigène de surface, présent seulement sur B19 S, représente le facteur responsable de la modification de grande amplitude et de longue durée neutralisé dans la préparation PB. Il faut noter que ce facteur résiste aux ultrasons puisque le BUS induit à peu près les mêmes changements que B19 S. L'action à court terme de B19 R pourrait être due à un facteur sous-jacent à l'antigène somatique et qui serait donc également présent chez B19 S. Il ne semble pas que l'effet induit par B19 R soit imputable à la présence d'un résidu d'antigène somatique à la surface de B19 R car d'une part nous n'avons pu, comme nous l'avons dit précédemment induire la formation d'agglutinines par injections de B19 R, d'autre part, l'augmentation de la dose de B19 S ne permet ni d'atteindre le niveau maximum de modifications induit par B19 S, ni de prolonger l'effet.

L'influence de Brucella abortus inactivée sur la réponse à un antigène figuré, thymo-dépendant (21) a été analysé à l'aide de deux paramètres : les " cellules formant plages d'hémolyse " représentent les cellules sécrétrices d'anticorps B19 S, quant aux " Rosettes " immunes, il est généralement admis qu'elles représentent deux populations cellulaires, l'une thymo-dépendante, capable de reconnaître l'antigène (117), l'autre, B-dépendante sécrétrice d'anticorps. Les résultats obtenus lors de l'immunostimulation par les différentes préparations de Brucella abortus montrent que les deux types de réponses sont différemment influencés. Alors qu'après B19 S la réponse en CFP subit une phase dépressive suivie d'une remontée tardive mais appréciable la réponse en CFR subit seulement une courte phase de dépression qui est suivie d'une longue phase de stimulation, puisqu'au 60ème jour le

le niveau des témoins est loin d'être retrouvé. Par contre, avec les préparations non agglutinogènes, la réponse est dans l'un et l'autre cas stimulée d'emblée; cependant alors que la réponse en CFR est favorablement influencée jusqu'au 20ème jour, la réponse en CFP subit un accroissement tardif.

Il semble que les adjuvants de l'immunité n'aient pas tous le même mode d'action,certains comme les polynucléotides agiraient au niveau des cellules B (17) d'autres au niveau des cellules T (comme l'a montré DRESSER (26) pour Bordetella pertussis).

S'il est évident que les CFP représentent des cellules formatrices d'anticorps, il est difficile de dire si l'effet est direct ou indirect puisque la réponse aux GRM est thymo-dépendante et que l'effet observé peut être le résultat de la coopération entre cellules T et B et non pas un effet direct sur les cellules B. D'autre part la nature des CFR que nous avons mises en évidence devra être précisée par la suite à l'aide notamment d'un sérum anti θ , bien que pour Cone et Wilson (22) la technique par centrifugation utilisée ici révèle les " cellules capables de reconnaître l'antigène " plutôt que les cellules formatrices d'anticorps. Cependant d'après Kapp et Benacerraf (53) il n'est pas impossible que les anticorps cytophiles fixés sur les macrophages aient donné lieu à la formation de CFR bien que celles-ci soient détectées au 4ème jour de l'immunisation.

S'il s'agit bien de CFR thymo-dépendantes nous serions dans la situation où les cellules T ont parfois un rôle suppressif sur les clelules B (5) (35). Situation que pourrait être intéressante dans les défenses antitumorales où les anticorps jouent parfois un rôle facilitant à condition que ces cellules soient analogues aux cellules actives en cytotoxicité.

Enfin, un véritable lipopolyoside (LPS) n'ayant pu être isolé à partir de Brucella abortus il n'existe pas de travaux analogues à ceux réalisés in vitro avec le LPS d'Escherichia coli ou d'autres antigènes ne nécessitant pas la présence du thymus pour la formation des anticorps par Moller (83) et Anderson et Moller (2) (84) montrant leur activité mitogène sur les cellules B. Par

contre, Kruger et Gershon (56) ayant comparé 10 antigènes dans leur pouvoir de stimuler in vivo la synthèse du DNA des thymocytes de la souris ont constaté que Brucella abortus inactivée en phase lisse était, de loin, l'antigène le plus efficace et pourrait donc être considéré comme un puissant agent stimulant des cellules T.

Une seconde constatation s'impose, alors que les préparations de Brucella abortus en phase lisse ne sont jamais immunostimulantes à l'égard de la réponse aux GRM lorsqu'elles sont injectées le même jour que l'antigène, les préparations non agglutinogènes sont d'emblée efficaces et le niveau de stimulation est élevé même lorsque les doses utilisées sont très faibles.

L'effet immédiat et important produit par B19 R et la préparation PB sur la réponse aux globules rouges de mouton exprimée soit par les " cellules formant plages " soit par les cellules formant " Rosettes " pourrait être dû à ce composant sous-jacent dont nous avons supposé l'existence. Il ne serait pas observé avec B19 S en raison de la forte immunogénicité de l'antigène de surface qui induirait une compétition antigénique. Sabolovic et Pilet (115) avaient suggéré l'existence d'une telle compétition vis-à-vis des globules rouges de mouton pour B19 S et Corynebacterium parvum injectés 4 jours avant l'antigène.

Par injection de sérum hyperimmun antibrucella à différents temps avant B19 S inactivée Toujas (132) a obtenu une augmentation de la stimulation. L'inhibition de la synthèse des anticorps lors de l'injection de la préparation PB et dans ce dernier cas, et l'amélioration du contact des immun-complexes avec les macrophages et les lymphocytes démontrée par Moller (82) jouent probablement un rôle important dans ce phénomène.

Ainsi Taussiq et Lachman (129) ont montré que la compétition antigénique entre les fragments Fc et Fab de l'IgG de lapin pouvait être abolie par administration d'antiserum dirigé contre l'antigène dominant (Fc).

Enfin, Tanaka et Coll. (127) ont montré que l'utilisation d'une cire D - acétylée peu immunogène, en lieu et place de la cire D encore immunogène et surtout du bacille tuberculeux complet, qui entre parfois en compétition lorsque l'antigène est faible, donnait des résultats plus satisfaisants en vue de l'induction d'un état d'hypersensibilité retardée à l'ovalbumine chez le cobaye.

Deux facteurs au moins seraient responsables de l'activité de B19 S sur les modifications du système Réticulo Endothélial et de la réponse aux globules rouges de mouton. Les effets observés seraient la résultante des actions de chacun des composants. Par contre B19 R étant dépourvu de l'antigène de surface ne mettrait en jeu qu'un seul facteur agissant à faible dose qui semble capable de stimuler à court terme. Il est possible que des injections réitérées de faibles doses de B19 R puissent permettre d'installer une immunistimulation permanente.

Les résultats observés sur l'infection à Klebsiella pneumoniae confirment les travaux antérieurs sur l'augmentation de la résistance aux infections induites par des bactéries gram négatif (27) (119) et en particulier lestravaux de Berger (7) utilisant Brucella abortus. Nos recherches confirment que, en ce qui concerne cette bactérie l'antigène de surface ne joue pas un rôle important lorsque l'immunostimulation est réalisée par voie intrapéritonéale puisque la souche utilisée par Berger était en phase rough. En ceci les Brucella semblent se distinguer de la plupart des bactéries gram négatif pour lesquelles l'activité sur les infections bactériennes a été attribuée à la présence, à la surface des bactéries, du lipopolyoside (Lancly) (53) Howard (45). Pour Berger l'activité des bactéries contre les infections bactériennes ne serait pas due seulement à l'endotoxine mais aussi à une composante protéïque qu'il a nommée protodyne d'abord étudiée chez Escherichia coli, mais retrouvée dans les Brucella. Il nous semble difficile de tirer des conclusions sur la nature des facteurs responsables del'activité par fractionnement après traitement par les ultrasons qui peut faire passer en solution des composants initialement liés à des structures insolubles.

L'immunostimulation à long terme, induite par Brucella abortus après injection sous-cutanée serait davantage influencée par la présence de l'antigène de surface. Ceci pourrait être rapproché des observations sur la réponse aux globules rouges de mouton où l'action à long terme paraît fonction de la présence ou de l'absence de l'antigène de surface.

L'action des ultrasons, peut être par un effet dépolymérisant, semble diminuer légèrement l'activité à court terme après injection intraveineuse.

La discordance apparente observée dans deux essais successifs de BUS filtré semble pouvoir recevoir une explication : la préparation T5 correspond à un temps de sonication de 20', la préparation MS1 a subi une sonication beaucoup plus importante, on peut alors penser que dans le premier cas les parois ont été désintégrées en fragment de taille plus grande que dans le second cas, fragments qui sont éliminés lors de la filtration. Ceci tendrait à démontrer que la structure de base de la paroi est nécessaire, sinon suffisante à l'activité induite par injection intrapéritonéale.

Le mécanisme par lequel l'injection intrapéritonéale de Brucella inactivée modifie la résistance de la souris à l'infection à Klebsiella pneumoniae induite par la même voie n'a pas été analysé. Cependant l'accroissement important de l'activité du SRE exprimée par l'index phagocytaire et par les enzymes lysosomales (131) (36) après injection de BUS ou de Brucella inactivée par la chaleur est en faveur de l'hypothèse du rôle important des macrophages bien que les Klebsiella ne soient pas des bactéries intracellulaires et que par ailleurs Fauve (31) ait démontré que l'augmentation de la résistance à Listeria monocytogènes des macrophages d'animaux, stimulés par les endotoxines, n'était pas entièrement corrélée aux modifications métaboliques. Cependant la composante cellulaire semble le facteur principal, comme l'ont montré Biozzi et Coll. (9) lors de l'infection à Salmonella enteritidis après injection intraveineuse ou intrapéritonéale de BCG ou de mycobactéries vivants ou tués; la résistance observée n'était pas en relation avec l'augmentation de la synthèse d'anticorps spécifiques. Whitby (137) avait déjà souligné le rôle primordial des macrophages dans l'élimination des bactéries du péritoine. Plus récemment, Fauve et Hevin (32) ont montré que les macrophages spléniques et hépatiques d'animaux stimulés par Corynebacterium parvum montraient une activité bactéricide accrue vis-à-vis de Listeria monocytogènes. Ceci peut sans doute expliquer les résultats obtenus à court terme par Adlam (1) sur la protection des souris contre l'infection à Brucella abortus, mais ne suffit peut être pas à expliquer la protection induite lorsque l'injection de Corynebacterium parvum précède de plusieurs jours l'inoculation des Brucella, comme l'ont montré Halpern (41) et Adlam (1). Les modifications induites par Brucella abortus

inactivée par voie sous-cutanée pourraient être d'un autre ordre et il n'est pas impossible que les cellules T jouent alors un rôle important comme l'ont montré Mackaness et ses collaborateurs (67) (68) dans la défense contre les Listeria.

La préparation de parois pures, de cytoplasme exempt de débris de parois, l'isolement de l'antigène de surface pourraient permettre d'analyser les rôles respectifs des différentes fractions isolées. Enfin l'analyse approfondie du mécanisme d'action devra tenir compte de l'importance de la voie d'inoculation.

Le développement de la leucémie de Charlotte Friend, myéloide de type érythroblastose, induite par un virus a été favorablement influencé par l'injection préalable de B19 S ou B19 R, l'immunostimulation à court terme ayant mis en jeu la voie intrapéritonéale, alors que l'immunostimulation à plus long terme utilisait la voie sous-cutanée, des expériences complémentaires devront être réalisées pour comparer ces deux voies dans des conditions identiques. Les résultats obtenus au 10ème jour montrent l'avantage de la voie intrapéritonéale pour cet intervalle de temps.

L'essai d'immunothérapie aux J + 1 aux J + 3, par voie intrapéritonéale, s'est soldé par un échec pour la souche B19 S qui a créé une facilitation alors que les résultats obtenus avec B19 R sont encourageants et soulignent à nouveau le fait que la présence de l'antigène de surface n'est pas dans tous les cas nécessaire à l'activité, bien que cependant sa présence à la surface de B19 S puisse expliquer le meilleur résultat obtenu au 10ème jour lors de l'immunostimulation par voie intrapéritonéale.

Ces résultats montrent que les Brucella inactivées sont capables de modifier avantageusement la réponse d'un organisme à une infection virale, non seulement à court terme comme l'ont montré Pilet et Coll. (99) (80) mais aussi à long terme. L'importance de l'intervalle de temps entre l'immunostimulation et l'infection est de nouveau apparue et toute étude sur le mécanisme d'un tel effet devra tenir compte de ce paramètre.

Il semble vraisemblable que le mécanisme responsable des effets observés mette en jeu les cellules de l'immunité cellulaire, les lymphocytes T. Levy et Coll. (63) ont en effet montré que le Poly IC qui a des effets marqués sur les tumeurs, viro-induites ou non, augmente les mécanismes de rejet vis-à-vis des antigènes étrangers.

Regelson et Coll. (106) (107) ont pu réaliser la prévention de la leucémie de Charlotte Friend dans la proportion de 50 à 80% suivant les modalités du traitement, par des polymères polyanioniques (poly IC, pyran copolymère) qui sont en même temps de bons inducteurs d'interféron et de puissants stimulants du SRE. Sur ce dernier point Brucella abortus inactivée présente une analogie certaine (131) (98) avec ces substances, par contre le niveau d'interféron, évalué par Rothier (114) dans la laboratoire de Microbiologie, Immunologie de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort est peu élevé, qu'il s'agisse de la souche B19 S comme l'avaient montré de Somer et Coll.(122) pour B19 S, de la souche B19 R et de ses ultrasonnats qui ont donné lieu à une faible induction d'interféron. il faut ajouter que récemment un travail réalisé dans le laboratoire du Pr. Chany (20) a mis en évidence les propriétés antivirales de Corynebacterium parvum contre l'infection léthale de la souris par le virus de l'encéphalomyocardite mais qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence une production d'interféron au niveau du sérum, pas plus d'ailleurs qu'au niveau des macrophages stimulés soit in vivo, soit in vitro.

Des essais de fractionnement réalisés par Pilet et Monteil (85) (100) conduisent à penser que le constituant actif serait une protéïne. Carver et Naficy (18) (19) avaient abouti aux mêmes conclusions en ce qui concerne le constituant responsable de l'activité de Corynebacterium parvum sur certaines infections virales.

Le fractionnement s'avère à nouveau une conditions nécessaire à la compréhension du mécanisme de l'activité observée sur le développement de la leucémie de Charlotte Friend, en effet l'interférence de plusieurs facteurs et une certaine toxicité des bactéries inactivées ou des ultrasonnats totaux pour les cultures de tissus peuvent rendre difficile l'analyse approfondie du phénomène.

CONCLUSION

Les recherches effectuées sur l'influence des préparations de Brucella abortus B19 S, B19 R et de la préparation PB sur les modifications du système réticulo-endothélial, de la réponse à un antigène figuré, les globules rouges de mouton, dépendant du thymus en ce qui concerne la production d'anticorps et de la résistance à Klebsiella pneumoniae et au virus responsable de la leucémie de Charlotte Friend, confirment et étendent les résultats déjà obtenus dans le laboratoire de Microbiologie et d'Immunologie de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort avec Brucella abortus B19 S inactivée; elles montrent que le mutant B19 R et la préparation PB, non agglutinogène peuvent également être considérés comme des immunostimulants. Les activités comparées ont fait apparaître des différences notables entre préparations agglutinogènes ou non. Ces dernières agissent plus rapidement et pendant une période plus limitée alors que les premières, présentent des phases inactives ou dépressives lors d'analyse de certains paramètres mais s'avèrent souvent plus actives à long terme. Les préparations non agglutinogènes pourraient présenter un triple avantage : utilisation de faibles doses, réponse immédiate, pas d'induction d'agglutinines. L'étude plus approfondie des mécanismes impliqués pourrait permettre d'élucider le phénomène mal expliqué de la compétition antigénique.

L'importance de l'intervalle de temps qui sépare l'immunostimulation de l'injection de l'antigène ou de l'épreuve virulente, déjà soulignée par Toujas et Coll. (131) est apparue dans tous les cas et doit être prise en considération dans l'étude des mécanismes.

Des recherches analogues à celles réalisées avec B19 S injectée en vue de modifier la réponse à une greffe tumorale doivent être mises en oeuvre avec les préparations non agglutinogènes.

La recherche d'une activité de type immunothérapie aussi bien antibactérienne, qu'antivirale ou antitumorale est souhaitable. La faible toxicité des Brucella inactivées et des préparations de type endotoxine déjà soulignée par Freedman (33) est un avantage certain dans l'éventualité de leur utilisation thérapeutique.

CHAPITRE III

APPROCHE IMMUNOLOGIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE DE LA VARIATION S-R.

Les faits ci-dessus montrent à l'évidence l'importance de la variation S R dans l'espèce Brucella abortus que ce soit dans le domaine de l'immunité spécifique ou dans le domaine de l'immunité non spécifique, et d'un point de vue plus général dans celui de l'immunologie fondamentale par exemple dans l'étude du phénomène de compétition antigénique ou d'un pouvoir mitogène. Les Brucella appartenant au groupe des bactéries gram négatif il était logique d'utiliser les techniques qui ont permis à Boivin (10) à Freeman (32) à Ribi (112) et enfin à Westphal (136) d'isoler soit des complexes glucido lipido-polypeptidiques, supports de l'activité endotoxinique, soit des polyosides, soit des lipopolyosides, ces deux derniers étant plus accessibles à l'analyse structurale.

A la suite des travaux de Wilson et Miles (139) sur la sérologie dans le genre Brucella, Miles et Pirie dans une série de travaux (75) à (80) ont tenté l'approche biochimique des deux spécificités de surface A et M. Leurs travaux ont surtout porté sur Brucella melitensis. Par extraction phénolique (Phénol à 2 %), ils ont isolé un gros complex PLAPS; cependant à côté d'un phospholipide et d'une protéine, une fraction AP, peut être obtenue par hydrolyse et reste porteuse de spécificités. L'analyse de ce composant leur a permis de mettre en évidence des groupes aminés formylés auxquels ils ont attribué un rôle important comme déterminants en raison du fait que la libération des groupements formyl s'accompagnait de la perte de la spécificité. Ces résultats n'ont été depuis ni confirmés, ni infirmés.

Parmi les travaux les plus importants, on peut ensuite noter ceux de Redfearn (105) qui en utilisant la méthode de Westphal a tenté de rechercher les spécificités sérologiques au niveau des différentes fractions. Il a isolé deux lipopolyosides, l'un dans la phase aqueuse qui, contrairement à ce qui se passe avec les enterobactéries, ne présente pas de toxicité et n'inhibe pas l'agglutination, l'autre dans la phase phénolique, qui inhibe l'agglutination. Des différences physiques importantes sont apparues entre les extraits de Brucella melitensis d'une part ceux de Brucella abortus et suis d'autre part. Dans le cas de Brucella melitensis une réaction croisée existe entre lipopolyoside de la phase aqueuse et celui de la phase phénolique. L'analyse structurale n'a pas été entreprise.

Viennent ensuite les recherches de Lacave (57) sur Brucella melitensis. Les résultats obtenus sont en contradiction avec ceux de Redfearn à propos des propriétés immunologiques du LPS de la phase aqueuse qui est trouvé actif, il est vrai en hémagglutination passive. Un 3 - 6 désoxysucre immunodominant de certaines Salmonella a été isolé à partir de ce LPS mais la structure antigénique complète n'a pas été élucidée.

Notre but initial était l'isolement d'une entité chimiquement bien définie, soluble et caractérisée d'un point de vue immunologique, de telle sorte qu'elle corresponde réellement à un antigène ou à un haptène responsable des propriétés agglutinogènes de Brucella abortus; par la suite il devrait être possible d'isoler des substances analogues à partir de Brucella melitensis et B.suis de manière à effectuer des réactions de précipitation quantitative dans le but d'apprécier les relations entre les trois espèces.

Auparavant, nous avons recherché si des différences pouvaient être mises en évidence entre les ultrasonnats de Brucella abortus B19 S et ceux de la souche 45/20 en phase rugueuse par la méthode d'hémagglutination passive (61)

Puis après des tentatives d'extraction d'une fraction polyosidique par hydrolyse acétique à partir de l'endotoxine selon Boivin et selon Ribi qui n'ont pas abouti et un essai d'extraction directe par la méthode de Freeman qui chez les Salmonella permet d'obtenir des polyosides pratiquement purs mais qui appliquée à Brucella abortus a donné un extrait riche en peptides, nous avons étudié la phase aqueuse de l'extrait selon Westphal (60).

MATÉRIELS ET MÉTHODES :

- Immunoélectrophorèse et hémagglutination passive :

L'antigène était constitué par des ultrasonnats de Brucella abortus en phase lisse B19, 544, 45/20 et en phase R. B19 R et 45/20. A partir de souches cultivées sur Albimi, nous avons préparé des suspensions à 500 mg/ml (en poids humide) en tampon volatil (bicarbonate d'ammonium 0,02 M amené à pH 7,2 par l'acide acétique). Ces suspensions ont été soumises à l'action des ultrasons pendant 30 minutes à 9 KC, centrifugées à 27,000 g pendant 30 minutes et les surnageants lyophylisés.

L'analyse chimique des ultrasonnats a comporté un dosage de N par la méthode de Kjeldahl, des protéines par le Biuret, des sucres par l'anthrone, des lipides libres par extraction au méthanol éther.

Les sérums étaient des sérums de lapin hyperimmuns (décomplémentés et absorbés par les globules rouges de mouton).

L'immunoélectrophorèse a été réalisée en gel d'agarose à 1,5 % en tampon véronal à pH 8,2 force ionique 0,05.

L'hémagglutination passive a été réalisée par la technique de Boyden (12) légèrement modifiée : le tannage réalisé à une concentration finale de 1/50.000 en tampon 0,15 M pH 7,2, et la sensibilisation à pH 6,3.

— L'extraction chimique a été réalisée par la technique de Westphal : 20 g (poids sec) de bactéries B19 S ou 45/20, préalablement débarrassées des lipides libres par extractions successives à l'acétone, ont été suspendus dans 700 ml de phénol à 15% à 45°C pendant 1/4 H. La phase aqueuse, obtenue après décantation a été centrifugée 30' à 27000 g et filtrée sur millipore 0,15 u de manière à éliminer d'éventuels débris cellulaires, et dialysée pendant 72 H.

Les acides nucléiques ont été mis en évidence par l'absorption au spectrophotomètre à 260 mu. Le dosage des acides aminés a été réalisé à l'aide de la ninhydrine et d'un standard de leucine après hydrolyse par NaOH N à 90°C pendant 2 H.30 (86)

Les sucres ont été dosés à l'anthrone (118) Les sucres réducteurs par la méthode de Park et Johnson (89). Le dosage du glucose a été réalisé à l'aide de la glucose oxydase (54). La glucosamine a été recherchée à l'aide de la méthode de Strominger (125) après hydrolyse par HCl 4N, 4 H.

La chromatographie des sucres après hydrolyse par HCl 2N à 110° en tube scellé pendant 2 H., a été faite sur papier Whatman N°I en solvant Butanol/ Pyridine/Eau (9/5/4), la révélation étant faite soit par le nitrate d'argent dans l'acétone (133), soit par le phtalate d'aniline (90), soit par la naphtylamine (91) soit par le réactif de Warren (134), à l'acide thiobarbiturique en vue de la mise en évidence des 3-6 didesoxy sucres, soit par le réactif de Weissbach (135) pour la recherche du KDO.

Les lipides éventuellement liés ont été recherchés après hydrolyse à reflux, dans CH_3COOH 0,1 N pendant 1 H.

La chromatographie sur tamis moléculaire a été réalisée sur un gel de polyacrylamide, le Bio-Gel P 150, mesh 50 - 100.

La chromatographie sur échangeur d'ions a été faite sur DEAE cellulose A 52 (Whatman).

La précipitation en milieu liquide et l'immunodiffusion simple, à l'aide d'hyperimmuns sérums de lapins, antibrucella B19 S ou 45/20, ont été utilisées pour détecter la présence des fractions immunologiquement actives. Le couplage d'un polyoside à une protéine, l'édestine a été réalisé selon Hammerling. (42).

RÉSULTATS

Analyse immunologique des ultrasonnats

L'analyse chimique globale des ultrasonnats a donné la composition suivante : 5,6 % d'N, 68 % de protéines, 7,35 % de lipides libres, 4 % de sucres. Les lipides liés n'ont pas été dosés.

L'analyse immunoélectrophorétique réalisée avec les ultrasonnats provenant des souches 45/0 et de son mutant rough la 45/20 a fait apparaître II lignes identiques de part et d'autre. (Fig. 20).

Le tableau 12 montre qu'il n'y a aucune corrélation entre les titres agglutinants et hémagglutinants et que les souches en phase Rough sont capables d'induire des taux d'hémagglutinines équivalents à ceux obtenus à partir de souches en phase rough.

Analyse immunochimique de la phase aqueuse

L'analyse chimique globale de la phase aqueuse a montré qu'elle était constituée à 80 % par des sucres non réducteurs, le reste étant composé d'acides nucléiques. Cet extrait total précipitait faiblement en milieu liquide.

Le passage sur Bio-gel P 150 en NaCl 0,15 M a permis d'obtenir, à l'exclusion, une substance X qui ne réagissait pas à l'anthrone, qui précipitait fortement les hyperimmuns sérums, puis, à l'inclusion, la majeure partie de la fraction riche en sucres à laquelle on peut assigner un poids moléculaire d'environ 40.000, ne précipitant pas avec les hyperimmuns sérums et enfin les acides nucléiques.

Le passage sur DEAE cellulose, qui avait pour but d'analyser les charges respectives des fractions a permis d'obtenir, d'emblée à l'exclusion, le composé riche en glucides, sans acides nucléiques; il s'agissait donc d'un polyoside neutre. Par contre, l'absence absolue

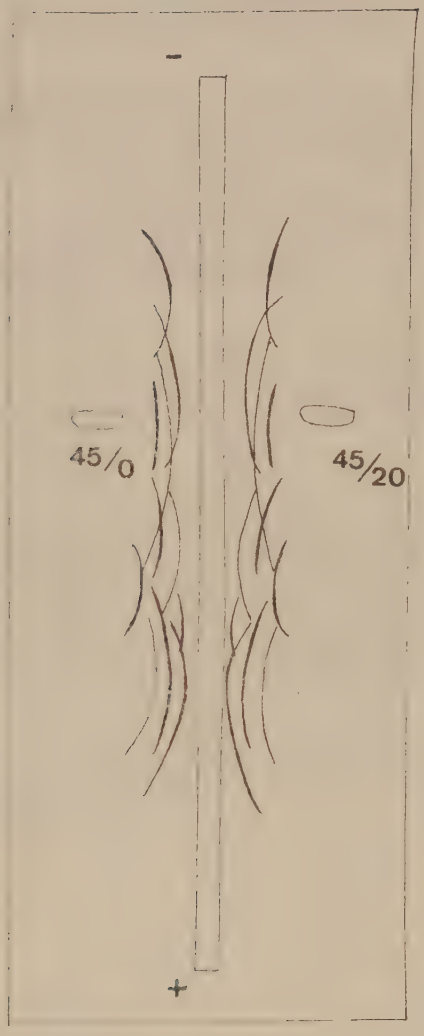


Figure 20: IMMUNOELECTROPHORESE des ultrasonnats 45/0(phase lisse) et 45/20(phase rugueuse) vis à vis d'un hyperimmun serum anti BRUCELLA ABORTUS 45/0.

TABLEAU XIV

Titre des anticorps agglutinants et hémagglutinants des sérums de lapins anti B19 S et anti 45/20, l'antigène étant 45/0

	Agglutination	Hémagglutination
Sérums normaux	-	-
	-	-
Sérums hyperimmuns anti B19 S	1/320	1/51200
	1/1280	1/51200
	1/640	1/102400
Sérums hyperimmuns anti 45/20	-	1/51200
	-	1/25600
	-	1/102400

de précipitation en milieu liquide montrait que le composant X était retenu. Par l'utilisation d'un tampon de faible force ionique (0,1 M) il a été possible de le détacher indépendamment des acides nucléiques.

Le dosage par la glucose oxydase et l'analyse chromatographique sur papier du polyoside ont montré qu'il était pratiquement composé uniquement de glucose. La recherche des lipides liés a montré qu'ils étaient peu abondants (1%).

La recherche des acides aminés dans les substances X s'est avérée positive, la proportion étant de 50 % pour X de B19 S et 80 % pour X de 45/20.

L'injection de 500 ug de polyoside avec ou sans couplage à l'édestine n'a pas permis d'obtenir des agglutinines après injection intraveineuse chez le lapin alors que la même quantité de X B19 S a permis d'obtenir un titre de 1/320ème et 1/10ème pour X 45/20.

Les quantités du composant X était très faibles et insuffisantes pour obtenir une inhibition de l'agglutination.

DISCUSSION

Les résultats obtenus en immunoélectrophorèse sont analogues à ceux de Thorel (130) qui n'a pu par l'utilisation de cette technique à partir d'ultrasonnats, mettre en évidence des différences entre souches en phase lisse et souches en phase rugueuse. Par contre, ils diffèrent de ceux de Hinsdill et Berman (44) qui, également à partir de Brucella abortus en phase lisse mettent en évidence 9 lignes de précipitation dont l'une est très diffuse, très proche du puits de l'antigène et immobile à l'électrophorèse, correspondrait à l'antigène de surface puisqu'elle disparaît après absorption par des bactéries entières. Il faut noter que récemment Diaz et Bosseray (24) ont mis en évidence par immunoprécipitation un composant qui serait spécifique des souches en phase rugueuse.

L'hémagglutination passive utilisant les globules rouges tannés met en évidence, comme l'a montré Boyden (12) des antigènes de nature protéique. Utilisée ici elle n'a pas permis non plus d'établir une différence entre souches en phase lisse et souches en phase rugueuse; ceci laisse penser que les déterminants antigéniques de la surface de Brucella abortus ne sont pas de nature protéique mais probablement de nature polyosidique comme c'est le cas pour la plupart des bactéries gram négatif. Ces résultats sont analogues à ceux de Diaz et Coll. (25) qui n'ont pu fixer les ultrasonnats de Brucella abortus sur globules rouges frais mais seulement sur globules rouges tannés sans pouvoir établir de distinction entre souches lisses et rugueuses alors que cela leur a été possible en utilisant la fixation sur globules rouges frais d'une endotoxine selon Ribi préalablement traitée par NaOHIN, ce que nous n'a n'avons pu nous même réaliser.

L'approche immunochimique que nous avons tentée, à partir de la phase aqueuse de l'extrait phénolique selon Westphal, permet de conclure que, contrairement à ce qui se passe avec les entérobactéries auxquelles la méthode a été largement appliquée, un véritable lipopolyoside de gros poids moléculaire, porteur de chaînes polyosidiques ne peut être retrouvé dans cette phase. Redfearn (105) avait déjà noté l'absence de propriétés toxiques de cette fraction extraite de Brucella alors qu'une certaine activité biologique était retrouvée dans la phase phénolique, fraction

qui était également capable d'inhiber l'agglutination. Plus récemment Renoux et Coll. (110) ont abouti à un résultat un peu différent puisque pour eux l'extrait de la phase aqueuse obtenu à partir de Brucella abortus est générateur d'agglutinines. Cependant ces auteurs concluent également que le glucose représente le constituant majoritaire de cette fraction et que le KDO en est absent. Ces résultats joints au fait que le passage sur tamis moléculaire assigne à ce composant un poids moléculaire très faible par rapport aux classiques lipopolyosides qui ont des poids moléculaires de 1 à plusieurs millions, l'absence presque complète de lipides, montrent qu'il ne s'agit pas vraisemblablement d'un véritable lipopolyoside.

Il est possible, comme Lacave (57) l'avait déjà mentionne pour Brucella melitensis qu'il s'agisse d'un glucane. Koeltzow (54) a extrait des galactanes à partir d'Aerobacter aerogènes.

Quant au composant X, il pouvait s'agir d'un polyoside acide puisqu'il est retenu sur DEAE cellulose. Lacave a mis en évidence la présence d'un polyoside acide chez Brucella melitensis. Cependant la contamination importante par les acides aminés ne nous permet pas de l'affirmer. Aucune réaction croisée n'a été observée avec l'antigène VI + de Salmonella typhi qui est également un polyoside acide. Il n'est pas impossible que la précipitation immunologique observée soit due au contaminant polypeptidique; il pourrait également s'agir de très petits fragments de parois ayant échappés à la centrifugation et à la filtration; dans ce cas la recherche de l'acide diaminopimélique devrait permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

+ Aimablement fourni par Mademoiselle A.M. STAUB
Chef de Service à l'Institut Pasteur de Paris.

CONCLUSION

Les méthodes immunologiques et immunochimiques utilisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence le constituant porteur des spécificités agglutinogènes de Brucella abortus.

Il semble que Brucella abortus plus encore que Brucella melitensis diffère dans sa structure antigénique des entérobactéries chez lesquelles on obtient un lipopolyoside porteur à côté d'un lipide A de chaînes oligosaccharidiques constituées de sucres dont la conformation et l'enchaînement sont à l'origine de la spécificité sérologique de ces germes. Déjà Miles et Pirie avaient mentionné les difficultés rencontrées en essayant d'appliquer à Brucella abortus les techniques qui avaient permis d'isoler le composant AP à partir de Brucella melitensis Redfearn (105) avait noté des différences importantes dans les propriétés physiques des fractions obtenues à partir de Brucella abortus par rapport à celles de Brucella melitensis. Il semblerait d'après les recherches de cet auteur qu'il faille plutôt s'orienter vers l'étude de la phase phénolique bien que Renoux et Coll. (111) aient obtenu des taux d'agglutinines équivalents à partir des phases aqueuse ou phénolique de Brucella abortus.

A noter que ce même type d'extraction n'a pas non plus permis d'obtenir un lipopolyoside à partir des Pasteurella, plus proches phylogénétiquement des Brucella que ne le sont les entérobactéries (59). Il est possible que l'étude de Yersinia enterocolitica type IX qui présente une forte réaction croisée avec Brucella abortus (3) puisse permettre une approche différente comme l'a tenté récemment Hurwell (47)

Enfin l'utilisation de méthodes moins drastiques que l'extraction phénolique est probablement souhaitable pour le genre Brucella afin d'extraire des fractions simples mais immunogènes. L'isolement à partir des souches S ou R d'un lipide analogue au lipide A des lipopolyosides des entérobactéries, auquel on attribue actuellement une grande part des propriétés stimulantes, pourrait permettre de savoir s'il représente le composé sous-jacent dont nous avons supposé l'existence.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La variation lisse rugueuse chez Brucella abortus a été le thème central de ce travail.

1°- Dans un premier temps, dans le but d'apporter une contribution à la compréhension des mécanismes de l'immunité dans la brucellose et à la mise au point de vaccins non agglutinogènes, nous avons voulu comparer les cinétiques d'apparition et les niveaux de l'immunité, chez la souris, de la souche vaccinale B19 S vivante ou inactivée et de son mutant rugueux inactivé.

La souris a été retenue comme animal d'expérience, le rat et le cobaye s'étant montrés peu réceptifs à Brucella abortus. Le nombre de germes retrouvés dans la rate a été pris comme critère d'infection.

Nous avons recherché ensuite s'il n'existait pas une lignée de souris présentant plus d'homogénéité que la souris Swiss C D1. Les lignées pures DBA2 et CBA, plus sensibles et donnant des résultats plus homogènes, pourraient permettre d'améliorer le contrôle des vaccins dirigés contre Brucella abortus.

L'immunité induite par B19 S vivante est apparue plus tardivement qu'avec B19 S et B19 R inactivée. Le niveau d'immunité le plus élevé a été obtenu pour B19 S vivante devant B19 S puis B19 R inactivées.

Le même type d'étude doit être poursuivi avec des vaccins en adjuvants huileux ou des vaccins type PB (pour lesquels les sites agglutinogènes sont saturés par des anticorps spécifiques). Il serait également souhaitable de poursuivre la recherche des médiateurs de l'immunité cellulaire dans les différents cas. Le transfert à des animaux syngéniques, de cellules immunocompétentes et de sérums contenant ou non des anticorps dirigés contre la surface, pourraient aussi amener à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'immunité antibrucellique.

2°- Dans la deuxième partie, nous avons comparé les propriétés immunostimulantes de B19 S et B19 R inactivées. Cette comparaison a porté sur les modifications

1) du système réticulo endothélial
2) de la réponse aux globules rouges de mouton.
3) de l'évolution de l'infection à Klebsiella pneumoniae.
4) de l'évolution de la leucémie induite par le virus de Friend.

L'hypertrophie de la rate et l'augmentation du nombre de cellules nucléées ont été plus marquées et plus durables avec injection intraveineuse de B19 S.

La réponse aux globules rouges de mouton a été différemment influencée après B19 S et B19 R.

Le nombre de " cellules formant plages d'hémolyse " n'est pas augmenté dans les jours qui suivent l'injection intraveineuse de B19 S mais seulement vers le 40ème jour, tandis que le nombre de cellules formant rosettes présente un maximum au 10ème jour, avec une décroissance très progressive. Après injection de B19 R on note un accroissement immédiat et important des réponses en CFP et CFR.

Ces résultats sont interprétés dans le sens d'une compétition antigénique entre B19 S et les globules rouges de mouton et laissent supposer l'existence chez Brucella abortus d'au moins deux facteurs différents capables de modifier la réponse aux globules rouges de mouton.

L'infection à Klebsiella pneumoniae de la souris a été favorablement influencée par une injection intrapéritonéale de B19 S ou B19 R inactivées par la chaleur ou par les ultrasons 3 jours avant l'infection. L'antigène de surface ne semble pas jouer le rôle essentiel dans ce processus; par contre il pourrait être nécessaire dans le cas d'une protection à long terme.

L'injection intraveineuse ou intrapéritonéale de B19 S et B19 R inactivées a permis d'augmenter le temps de survie des animaux recevant ensuite le virus de la leucémie de Charlotte Friend. L'immunothérapie mise en oeuvre dans les jours qui suivent l'infection virale a été suivie de succès dans le cas de B19 R seulement, ceci pose à nouveau le problème d'une éventuelle compétition antigénique dans le cas de B19 S.

Les recherches doivent être poursuivies en vue d'une utilisation non seulement préventive mais thérapeutique de Brucella abortus comme immunostimulant contre les maladies bactériennes virales ou tumorales.

Enfin, nous avons tenté une approche immunologique et immunochimique du substrat de la variation lisse rugueuse.

L'utilisation de l'immunoélectrophorèse n'a pas permis de mettre en évidence un antigène supplémentaire chez B19 S. L'hémagglutination passive sur hématies tannées n'a pas fait apparaître de différence entre souches lisses et rugueuses, il semblait donc que le substrat de la variation n'était pas de nature protéinique mais probablement polyosidique. Cependant l'utilisation de la méthode de Westphal qui conduit chez les entérobactéries à l'extraction des lipopolyosides porteurs des spécificités antigéniques de surface a conduit à l'extraction d'un glucane de faible poid moléculaire non hapténique. Une faible quantité d'un composant à caractère faiblement acide capable d'induire la formation d'agglutinines est retrouvée à côté de cette fraction, cependant sa nature n'a pu être élucidée.

D'autres modes d'extraction doivent être envisagés dans le but d'isoler le constituant responsable de la variation lisse ⟶ rugueuse.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ADLAM (C) BROUGHTON (E.S.) SCOTT (M.T.) - *Enhauced resistance of mice to infection with bacteria following pre-treatment with Corynebacterium parvum.*
Nature New Biology - 235 - 219 (1972

2 - ANDERSON (J) MÖLLER (G) SJOBERG (O) - *Selective induction of DNA synthesis in T and B lymphocytes*
Cellul. Immunol. 4 - 381- 1972

3 - AHVONEN (P) JANSSON (E) et AHO (K) -*Marked cross agglutination between Brucellae and subtype of Yersinia enterocolitica*
Acta Path. et Microbiol. Scandin. 75. 291 - 1969

4 - ASAKAWA (Y) - *Studies on experimental brucellosis of mice with special reference to the response of different mouse strains.*
Bull. Exp. Anim. (Tokyo) 8 - 135 - 1959

5 - BAKER (P.J.) BARTH (R.F.) STASHAK (P.W.) AMBAUGH (D.F.) - *Enhancement of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide in mice treated with antilymphocyte serum*

6 - BERGER (F.M.) FUKUI (G.M.) LUDWIG (B.J.) and ROSSELET (J.P.) - *Increase of non specific resistance to infection by protodyne, a protein component direved from bacterial protoplasm.*
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 127
556 - 1968

7 - BERGER (F.M.) FUKUI (G.M.) LUDWIG (B.J.) ROSSELET (J.) - *Increased host resistance to infection elicited by lipopolysaccharides from Brucella*
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131
1376 - 1969

8 - BIOZZI (C) STIFFEL (C) MOUTON (D) BOUTHILLIER (Y) and DECREUSEFOND (C) - *A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunised with S.R.B.C.*
Immunology 14 - 7 - 1968

9 - BIOZZI (C) STIFFEL (C) HALPERN (B.N.) MOUTON (D) - *Recherches sur le mécanisme de l'immunité non spécifique produite par les mycobactéries.*
Rec. Fr. Etud. Clin. et Biol. 5
876 - 1960

10 - BOIVIN (A) MESROBEANU (L) - *Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries.*
Rev. Immunol. 1 - 553 - 1935

11 - BONNEAU (M) VALETTE (L) PILET (CH.) - *Complexe antigène-anticorps et immunité antibrucellique.*
Progr. Immun. Biol. Stand. 5 - 537
1972

12 - BOYDEN (S.V.) - *The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.*
J. Exp. Med. 93 - 107 - 1951

13 - BRAUN (W) BONESTELL (A.G.) - *Independant variation of characteristics in Brucella abortus variants and their detection.*
Amer. J. Vet. Res. 9 - 386 - 1947

14 - BRAUN (W) et CIACCIO (E) - *Determination of mutation rates in Brucella abortus involning alanine resistance colonial and antigenic characteristics.*
Bact. Proc. 41 - 1952

15 - BROWNLEE (S.T.)
Ph. D. Thesis : Duke University 1964

16 - BUDDLE (M.B.) and BOYES (B.W.) *A Brucella mutant causing genital diseases of sheep in New Zealand.*
Austr. Vet. J. 29 - 145 - 1953

17 - CAMPBELL (P.A.) KIND (P) - *Bone marrow derived cells as target cells for polynucleotides adjuvants.*
J. of Immunol. 107 - 1419 - 1971

18 - CARRERE (L) ROUX (J) MANDIN (J) SUIRE (V) - *La brucellose expérimentale du rat blanc.*
Comptes Rendus Soc. Biol. 149 - 780 - 1955

19 - CARVER (D.H.) - *Inhibition of Arbor viruses (group A) by a protein like component of a Corynebacterium.*
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111 356 - 1962

19 Bis - CARVER (D.H.) NAFICY (K) - *Studies on viral inhibition of biological origin : inhibition of viral replication by protein like constituents of bacteria.*
Proc. Soc. Ecp. Biol. Med. 116 548 - 1964

20 - CERUTTI (I) - *Considérations sur l'induction de facteurs non spécifiques de défenses.*
Diplôme de l'Ecole des Hautes Etudes 1973 - Paris.

21 - CLAMAN (H.N.) and CHAPERON (E.A.) - *Immunologic complementation between thymus and marrow cells, a model for the two-cells theory of immunocompetence.*
Transplantation Rev. 1 - 92 - 1969

22 - CONE (R.E.) WILSON (J.D.) - *Adjuvant action of Poly A.U. on T and B rosette - forming cells in S.R.B.C. immunized mice.*
Int. Arch. Allergy. 43 - 123 - 1972

23 - COTTON (W.E.) BUCK (J.M.) SMITH (H.E.) - *Efficacy and Safety of abortion vaccines prepared from Brucella abortus strains of different degrees of virulence.*
J. Agr. Res. 46 - 291) 1933

24 - DIAZ (R) et BOSSERAY (N) - *Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse des Brucella.*
Ann. Rech. Vet. 4 - 283 - 1973

25 - DIAZ (R) JONES (L.M.) LEONG (D) WILSON (J.B.) - *Differences between Brucella antigens involed in indirect hemagglutination tests with normal and tanned red blood cells.*
J. Bact. 94 - 499 - 1967

26 - DRESSER (D.W.) - *The role of T cells and adjuvants in the immune response of mice to foreign erythrocytes.*
Europ. J. Immunol. 2 - 50 - 1972

27 - DUBOS (R.J.) SCHAEDLER (R.W.) - *Reversible changes in the susceptibility of mice to bacterial infections. I changes brought about by injection of Pertussis vaccine or of bacterial endotoxins*
J. Exp. Med. 104 - 53 - 1956

28 - ELBERG (S.S.) SCHNEIDER (P) and FONG (J) - *Cross immunity between Brucella melitensis and Mycobacterium tuberculosis, intracellular behaviour of Brucella melitensis in monocytes from vaccinated animals.*
J. Exp. Med. 105 - 545 - 1957.

29 - ELWOOD (D.C.) KEPPIE (J) SMITH (J) - *The chemical basis of the virulence of Brucella abortus. VIII - the identity of pirified immunogenic material from culture filtrate and from cell wall of Brucella abortus grown in vitro.*
Brit. J. Exp. Path. 48 - 28 - 1967

30 - FAUVE (R.M.) DELAUNAY (A) - *Action d'une endotoxine sur les macrophages de souris NCS.*
Colloque C.N.R.S. Paris Octobre 1967
N° 174 P. 411

31 - FAUVE (R.M.) HEVIN (M.B.) - *Pouvoir bactéricide des macrophages spléniques et hépatiques de souris envers Listeria monocytogènes.*
Ann. Inst. Past. 120 - 399 - 1971

32 - FREEMAN (G.G.) - *The preparation and properties of a specific polysaccharide from typhosum Ty 2*
Biochem. J. 36 - 340 - 1942

33 - FREEDMAN (H.H.) FOX (A.E.) WILLIS (R.S.) SCHARTZ (B.D.) - *Induced sensitization of normal laboratory animals to Brucella abortus endotoxin.*
J. Bact. 95 - 286 - 1968

34 - GAUMONT (R) TRAP (D) THOREL (M.F.) GAYOT (G) PIERRE (F) DHENNIN (L) *Immunisation de la génisse contre l'infection expérimentale à Brucella abortus, comparaison de sept vaccins.*
Bull. Off. Int. Epiz. Rapport N° 128 - 1973

35 - GERSHON (R.K.) COHEN (P) HENCIN (R) LIEBHABER (S.A.)- *Suppressor T cells*
J. of Immunol. 108 - 586 - 1972

36 - GHEBREHIWET (B) - *Immunostimulation par les Brucella et facteurs humoraux non spécifiques:le complément et le lysozym*
Thèse d'Université - Paris 1973 (en préparation)

37 - GOODLOV (R.J.) MIKA (L.A.) BRAUN (W) - *The effect of metabolites upon growth and variation of Brucella abortus.*
J. of Bact. 60 - 291 - 1950

38 - GORET (P) PILET (CH.) - *Le vaccin B19 S dans la prémunition anti-brucellique des bovins.*
Rec. Méd. Vet. 138 - 371 - 1963

39 - GRAY (M.L.) STAFSETH (H.J.) THORP (F.J.) SHOLL (L.B.) RIBEY (W.F.)
A new technique for isolating listerellae from the bovine brain.
J. of Bact. 55 - 471 - 1948

40 - HALPERN (B.N.) BIOZZI (G) STIFFEL (C) MOUTON (D) - *Effet de la stimulation du SRE par inoculation du BCG sur le développement de l'épithélioma atypique T8 de Guérin chez le rat*
Compte rendus Soc. Biol. 153 - 919 - 1959

41 - HALPERN (B.N.) - *Immunité non spécifique - Facteurs cellulaires*
Bull. Assoc. Vét. Microb. 7 - 3 - 1970

42 - HAMMERLING (V) -
Thèse Université Fribourg Allemagne 1965

43 - HENRY (B.S.) - *Dissociation in the genus Brucella.*
J. Infect. Dis. 52 - 374 - 1933

44 - HINSDILL (R.D.) BERMAN (D.T.) - *Antigens of Brucella abortus. I Chemical ans immunoelectrophoretic characterization.*
J. of Bact. 93 - 544 - 1967

45 - HOWARD (J.G.) - *Activation of the R.E.S. of the mouse liver by bacterial lipopolysaccharide*
J. Path. Bact. 78 - 465 - 1965

46 - HUDDLESON (I.F.) and ABELL (E) - *Behavior of Brucella melitensis and abortus toward gentian violet.*
J. of Bact. Infect. Dis. 43 - 81 - 1928.

47 - HURWELL (B) - *Serological cross reactions between different Brucella species and Yersinia entero-colitica. An immunological and immuno-chemical stydy.*
Thèse Vétérinaire Stockholm 1973

48 - JACOTOT (H) VALLEE (A) -*Sur la réceptivité expérimentale de la souris blanche aux brucelles.*
Ann. Inst. Past. 84 - 964 - 1953

49 - JACOTOT (H) VALLEE (A) - *Essai d'immunisation du rat blanc contre la brucellose.*
Ann. Inst. Past. 94 - 372 - 1958

50 - JERNE (N.K.) NORDIN (A.A.)- *Plaque formation in agar by single antibody producing cell population.*
Science 140 - 405 - 1963

51 - JONES (L.M.) MONTGOMERY (V) and WILSON (J.B.) - *Characteristics of carbon dioxide independant cultures of Brucella abortus isolated from cattle vaccinated with strain 19.*
J. of Infect. Dis. 115 - 312 - 1965

52 - JONES (L.M.) BERMAN (D.T.) - *Antibody response delayed hypersensi-tivity and immunity in guinea-pigs induced by Smooth and Rough strains of Brucella abortus.*
J. of Infect. Dis. 124 - 47 - 1971

53 - KAPP (J) BENACERRAF (B) - *The rosette cell response of several mouse strains to immunization with both sheep and pigeon erytrovytes, magnitude of errors caused by cytophilic antibody.*
Europ. J. Immun. 2 - 467 - 1972

54 - KOELTZOW (D.E.) EPLEY (J.D.) CONRAD (H.E.) - *The lipopolysaccharides of aerobacter aerogenes strains A3S1 and NCTC 243.*
Biochem. 7 - 2920 - 1968.

55 - KRUGER (L) LUDERITZ (O) STROMINGER (J.L.) WESTPHAL (O) - *Zur Immunchemie der O Antigene von Enterobacteriacées.*
Biochem. Z - 335 - 548 - 1961

56 - KRUGER (J) and GERSHON (R.K.) - *DNA synthetic response of thymocytes to a variety of antigens.*
J. of Immunol. 108 - 581 - 1972

57 - LACAVE (CH.) - *Quelques aspects de la composition chimique et des propriétés biologiques des parois de Brucella*
Thèse de Doctorat ès Sciences
Toulouse 1969

58 - LANDY (M) - *Increase in resistance following administration of bacterial lipopolysaccharides.*
Ann. N.Y. Acad. Sci. 66 - 292 - 1956

59 - LARRABEE (A.R.) MARSHALL (J.D.) et CROZIER (D))- *Lipopolysaccharide protein complex and R and S antigens.*

J. of Bact. 90 - 116 - 1965

60 - LE GARREC (Y) - *Sur la mise en évidence d'un composé à caractère acide, porteur de la spécificité antigénique chez Brucella abortus.*
Comptes Rendus Acad. Sc. série D 269
1897 - 1969

61 - LE GARREC (Y) SABOLOVIC (D) LAUQUIN (G) PILET (CH.) - *Hémagglutination passive et diagnostic de la Brucellose.*
Intern. Symposium on Brucellosis
Tunis 1968
Symp. Séries Immunobiol. Srandard Vol. 12
p. 347 - Karger/Basel, New-York 1970

62 - LE GARREC (Y) SABOLOVIC (D) TOUJAS (L) GUELFI (J) PILET (CH.)
Activity on murine tumours of inactived Brucella: prophylactic effect and association to specific immunostimulation.
Biomédecine express (à paraître)

63 - LEVY (H.B.) ASOFSKY (R) RILEY (F) GARAPIN (A) CANTOR (H) ADAMSON (R) - *The mechanism of the antitumor action of poly I poly C.*
Ann. of the New York Acad. Sc; 173 640 - 1970

64 - LIVE (I) GIULIANI (L.A.) - *Protective effet of sera from animals treated with different Brucella antigens upon Brucella infection in mice.*
J. of Immunol. 71 - 187 - 1953

65 - LUDERITZ (O) JANN (K) and WHEAT (R) - *Somatic and capsular antigens of the gram negative bacteria.*
in Comprehensive Biochemistry Edited by Elorkin and Stotz 26 A. p. 105 - 1968 Elsevier Publi. Comp. Amsterdam.

66 - MACKANESS (G.B.) - *The immunological basis of acquired cellular resistance.*
J. Exp. Med. 120 - 105 - 1964

67 - MACKANESS (G.B.) - *The influence of immunologically comitted lymphoid cells on macrophage activity in vivo.*
J. Exp. Med. 129 - 973 - 1969

68 - MACKANESS (G.B.) HILL (W.C.) - *The effet of antilymphocyte globuline on cell mediated resistance to infection.*
J. Exp. Med. 129 - 993 - 1963.

69 - Mc DIARMID (A) SUTHERLAND (F.B.) - *A comparison of the immunity produced in guinea-pigs by the inoculation of living, heat kibled and adjuvant vaccines prepared from Brucella abortus strain 45/20 and S 19.*
The Vet. Rec. 69 - 1067 - 1957.

70 - Mc EWEN (A.D.) - *Further experiments on the infectivity of vaccine prepared from Brucella abortus strain 45/20 for cattle.*The Veter. Rec. 58 - 3 - 1946

71 - Mc GREGOR (D.D.) KOSTER (F.T.) - *The mediator of cellular immunity IV cooperation between lymphocytes and mononuclear phagocytes.*
Cellular Immunol. 2 - 317 - 1971.

72 - MANN (H.B.) WHITNEY (D.R.) - *On a test of whether one or two random variables is stochastically larger than the other.*
Ann. Math. Statist. 18 - 50 - 1947.

73 - MATHE (G) AMIEL (J.L.) SCHWARZEABERG (L) SCHNEIDER (H) CATTAN (A) SCHLUMBERGER (J.R.) HAYAT (H) de VASSAL (F) - *Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia.*
Lancet. 1 - 697 - 1969.

74 - MEYER (M.E.) CAMERON (H.S.) - *Species metabolic patterns in morphologically similar gram negative pathogens.*
J. Bacter. 73 - 158 - 1957

75 - MILES (A.A.) - *The antigenic surface of Smooth Brucella abortus and melitensis.*
Brit. J. Exp. Path. 20 - 63 - 1939.

76 - MILES (A.A.) and PIRIE (N.W.) - *The properties of antigenic preparation from Brucella melitensis I Chemical and Physical properties of bacterial fractions.*
Brit. J. Exp. Path. 20 - 83 à 98.

77 - MILES (A.A.) and PIRIE (N.W.) - *II - Serological properties of the antigens.*
Brit. J. Exp. Path. 20. 109 - 1939

78 - *III - The biological properties of the antigens and the products of gentle hydrolysis.*
Brit. Exp. Path. 20 - 278 - 1939

79 - *IV - The hydrolysis of the formamino liukage.*
Biochem. J. 33 - 1709 - 1939

80 - *V - The hydrolysis and acetylation of the amino polyhydroxy compouns derived from the antigen.*
Biochem. J. 33 - 1716 - 1939

81 - MISHRA (U) - *Action des extraits de Brucella sur l'évolution de quelques infections virales de la souris.*
Thèse d'Université Paris 1973
(en prēparation).

82 - MOLLER (G) - *Induction of DNA synthesis in normal human lymphocyte culture by antigen antibody complexes.*
Clin Exp. Immunol. 4 - 65 - 1969

83 - MOLLER (G) COUTINHO (A) - *B cells mitogenic properties of thymus independant antigens.*
Nature New Biology 245 - 12 - 1973

84 - MOLLER (G) ANDERSSON (G) SJOBERG (O) - *Lipopolysaccharides can convert hetero logous red cells into thymus independant antigens.*
Cellul. Immunol. 4 - 416 - 1972

85 - MONTEIL (J.C.) PILET (CH.) MISHRA (U) - *Antiviral properties of inactived Brucella abortus*
III - Attempts tu purify active substances
(en publication).

86 - MOORE (S) and STEIN (W.H.) - *Photometric ninhydrine method for use in the chromatography of amino acids.*
J. Biol. Chem. 176 - 367 - 1948

87 - NORTH (R.J.) MACKANESS (G.B.) ELLIOT (R.W.) - *The histogenesis if immunologically comitted lymphocytes.*
Cellul. Immunol. 3 - 680 - 1972

88 - OLITZKI (A.L.) - *Methods of determination of virulence of Brucellae in white mice.*
Refuah Veter. 12 - 257 - 1955

89 - PARK (J.T.) JOHNSON (M.J.) - *A submicrodetermination of glucose.*
J. Biol. Chem. 181 - 149 - 1949.

90 - PARTRIDGE (S.M.) - *Aniline hydrogen phtalate as a spraying reagent for chromatography of sugars.*
Nature 164 - 443 - 1949

91 - PETEK (F) - *Recherches sur les activités hydrolysantes et transférantes des α galactosidases.*
Thèse d'Université (Pharmacie) Paris 1962

92 - PILET (CH.) - *Essai d'immunisation du rat blanc contra la brucellose à l'aide la la souche 45/20 tuée en excipient irrésorbable*
Bull. Acad. Vét. 32 - 305 - 1959

93 - PILET (CH.) BONNEAU (M) - *Sur un nouveau vaccin antibrucellique non agglutinogène : le vaccin PB.*
Rec. Méd. Vét. 145 - 25 - 1970

94 - PILET (CH.) LE GARREC (Y) - *Contrôle sur petits animaux de laboratoire du pouvoir des vaccins antibrucelliques inactivés.*
I - Sur le choix des espèces animales et de l'époque du sacrifice.
Ann. Inst. Past. 110 - 755 - 1966

95 - *II - Sur les modalités de traitement avant ensemencement des organes infectés : résultats, conséquences.*
Ann. Inst. Past. 112 - 384 - 1967

96 - *III - Sur l'opportunité de la conservation à basse température des organes infectés avant ensemencement.*
Ann. Inst. Past. 112 - 516 - 1967

97 - PILET (CH.) LE GARREC (Y) - *Immunostimulation non spécifique par Brucella abortus inactivée, vis-à-vis de l'infection à Klebsiella pneumoniae de la souris.*
En préparation.

98 - PILET (CH.) LE GARREC (Y) TOUJAS (L) SABOLOVIE (D) MONTEIL (J.C.) ROTHIER (F) MISHRA (U) GHEBREHIWET (B) - *Non specific stimulation by inactivated or ultra sonificated Brucella abortus.*
Symposium C.N.R.S. 1971
Springer Verlag

99 - PILET (CH.) MONTEIL (J.C.) MISHRA (U) - *Antiviral properties of inactivated Nrucella abortus.*
I - Evidence for the activity of lysats

En publication.

100- PILET (CH.) MONTEIL (J.C.) - *II - Attemps to identify the nature of the active substances.*
En publication

101 - PILET (CH.) SABOVIC (D) - *Brucella abortus et immunothérapie active non spécifique de la tumeur d'Ehrlich.*

Bull. Ass. Franç. Vét. Microb. Imm. 7 - 43 - 1970

102 - RAMON (G) RICHOU (R) THIERY (J.P.) - *Sur quelques nouvelles substances adjuvantes et stimulantes de l'immunité.*

Comptes Rendus Acad. Sc. 228 - 1680 - 1949

103 - RAMON (G) RICHOU (R) THIERY (J.P.) GERBEAUX (C) - *De l'influence comparée de diverses substances stimulantes sur l'accroissement de l'immunité.*

Comptes Rendus Acad. Sc. 229 - 278 - 1949

104 - RASOOLY (G) - *Isolation of immunizing substances of Brucellae, their chemical properties and their biological antiviti*
Ph. Thesis, Hebrew University Jerusalem 1966

105 - REDFEARN (M.S.) - *An immunochemical study of antigens of Brucella extracted by Westphal technique.*

PhD Thesis, University of Wisconsin 1960

106 - REGELSON (W) and FLOTYN (O) - *Prevention and treatment of Friend leukemia virus by polyanious and PHA.*
Proc. Amer. Canc. Res. 7 - 58 - 1966

107 - REGELSON (W) and MUNSON (A.E.) - *The reticulo endothelial effects of interferon inducers polyanionic and non anionic, phylaxis against microorganisms.*

Ann. New York Acad. of Sc. 173 - 831 - 1970.

108 - RENOUX (G) - *Etudes sur la Brucellose ovine et caprine I - Choix d'une souche infectante de Brucella melitensis : calcul de la D 50 pour le cobaye et la souris.*
Arch. Inst. Past. Tunis. 32 - 51 - 1955

109 - RENOUX (G) - *Recherche des microorganismes dans les tissus animaux après broyage en masse des échantillons Application aux Brucella.*

Ann. Inst. Past. 106 - 126 - 1964

110 - RENOUX (G) et MAHAFFEY (L.W.) - *Sur l'existence probable de nouveaux antigènes de Brucella avec un nouveau schéma proposé pour représenter la répartition des antigènes.*

Ann. Inst. Past. 88 - 528 - 1955

111 - RENOUX (G) RENOUX (M) TINELLI (R) - *Phenol-water fractions from Smooth Brucella abortus and melitensis immunochemical analysis and biologic behavior.*

J. of Infect. Dis. 127 - 139 - 1973

112 - RIBI (E) MILNER (K.C.) PERRINE (T.D.) - *Endotoxic and antigenic fractions from the cell wall of Salmonella enteritidis.*

J. of Immunol. 82 - 75 - 1959

113 - de ROPP (R.S.) - *The propagation of Brucella abortus in the mouse.*
J. Comp. Path. and Therap. 55 - 85 - 1945

114 - ROTHIER (F) - *Synthèse d'interféron et immunostimulation par Brucella abortus inactivée.*
Thèse d'Université - Paris 1973 en préparation

115 - ROWLEY (D) - *Stimulation of natural immunity to Escherichia Coli infections.*
Lancet 1 - 232 - 1955

116 - SABOLOVIC (D) PILET (CH.) - *Compétition antigénique entre Brucella abortus, Corynebacterium parvum et globules touges de mouton.*

Bull. Ass. Franç. Vēt. Microb. Imm. 5
147 - 1970

117 - SCHLESINGER (M) - *Anti antibodies for detecting T dependent lymphocytes in immune response of mice to SRBC.*
Nature 226 - 1254 - 1970

118 - SCOTT (T.A.) HELVIN (E.H.) - *Determination of dextran with anthrone.*
Analyt. Chem. 25 - 1656 - 1953

119 - SHILO (M) - *Non specific resistance to infections.*
Annual Rev. Microb. 13 - 255 - 1959

120 - SHRIGLEY (E.W.) and IRWIN (M.R.) - *On the differences in activity of serum complement from various animal species.*

J. of Immunol. 32 - 281 - 1937

121 - SMITH (TH.) and FABYAN (M) - *Uber die pathogene Wirking des Bacillus abortus Bang.*
Zbl. Bakt. Parasikde Abt. I : 62 -
549 - 1912

122 - de SOMER (P) de CLERQ (E) COCITO (C) BILLAU (A) - *Tne interferon inducer from Brucella.*
Ann. of the New Yors Acad. Sc. 173 - 274
1970.

123 - STABLEFORTH (A.W.) - *Virulence tests and immunization with living, killed and fraction vaccines.*
Proc. 4th Int. Congr. Microb. Copenhague 1947 p. 236 (Rossenkilde and Bagger, Copenhagen 1949).

124 - STAUB (A.M.) WESTPHAL (O) - *Etude chimique et biochimique de la spécificité immunologique des polyosides bactériens.*
Bull. Soc. Chim. Biol. 46 - 1647 - 1964

125 - STAUB (A.M.) - *Base chimique de la spécificité des polyosides bactériens et des groupes sanguins.*
Bull. Inst. Past. 6 - 111 - 1968

126 - STROMINGER (J.L.) PARK (J.T.) THOMPSON (R.E.) - *Composition of cell wall of staphylococcus aureus : its relation to the mechanism of action of penicillin.*
J. Biol. Chem. 234 - 3263 - 1959

127 - TAKAHASHI (T) MOND (J.J.) CARSWELL (E.A.) and THORBECKE. - *The importance of Θ and Ig bearing cells in the immune response to various antigens.*
J. of Immunology 107 - 1520 - 1971

128 - TANAKA (A) ISHIBASHI (T) SUGUYAMA (K) and TAKAMOTO (M) - *Immunological adjuvants VI An acetylated mycobacterial adjuvant lacking competing antigenicity.*
Z. Immun Forsch Bol. 142 S - 303 - 1971

129 - TAUSSIG (M.J.) LACHMANN (P.J.) - *Studies on antigenic competition by antibody against or tolerance to the dominant antigen : a model for antigenic competition.*
Immunology 22 - 185 - 1972

130 - THOREL (M.F.) - *Etude immunoelectrophorétique des antigènes dans le genre Brucella.*
Thèse de 3ème cycle (Physiologie cellulaire)
Paris 1967

131 - TOUJAS (L) SABOLOVIE (D) DAZORD (L) LE GARREC (Y) TOUJAS (J.P.) GUELFI (J) PILET (CH.) - *The mechanism of immunostimulation induced by inactivated Brucella abortus.*
Rev. Europ. Rt. Clin. Biol. 17 - 167 - 1972

132 - TOUJAS (L) DAZORD (L) GUELFI (J) - *Augmentation des propriétés immunostimulantes de Brucella abortus B19 S inactivée, par l'action conjuguée d'un antiserum spécifique.*
Comptes Rendus Acad. Sc. (Série D) 276 - 433 - 1973

133 - TREVELYAN (W.E.) PROCTER (D.P.) et HARRISON (J.S.) - *Detection of sugarson paper chromatograms.*
Nature - 166 - 444 - 1950

134 - WARREN (L) - *Thiobarbituric spray reagent for deoxysugars and sialic acids.*
Nature 186 - 237 - 1960

135 - WEISSBACH (A) HURVITZ (J) - *The formation of 2 keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of Escherichia coli B*

J. Biol. Chem. 234 - 705 - 1959.

136 - WESTPHAL (O) LUDERITZ (O) BISTER (F) - *Uber die extraktion von bakterien mit Phenol/Wasser.*

Zeit. Naturforsch B 148 - 1952

137 - WHITBY (J.L.) ROWLEY (D.A.) - *The role of macrophages in the elimination of bacteria from mouse peritoneum.*
Brit. J. Exp. Path. 40 - 358 - 1959

138 - WHITE (P.G.) and WILSON (J.B.) - *Differentiation of Smooth and non Smooth colonies of Brucella.*

J. of Bacter. 61 - 239 - 1951.

139 - WILSON (G.S.) MILES (A.A.) - *The serological differentiation of Smooth strains of the Brucella group.*
Brit. J. Exp. Path. 13 - 1 - 1932.

Chatenay-Malabry, le 5 Novembre 1973

Vu et permis d'imprimer,

Le Vice-Président,

Y. Cohen